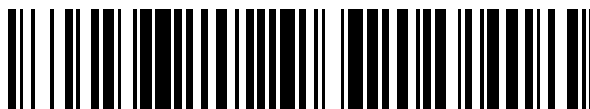


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 762**

51 Int. Cl.:

A61K 47/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2012** **PCT/US2012/057384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013** **WO13049247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2012** **E 12768999 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018** **EP 2760475**

54 Título: **Proteínas de fusión para el tratamiento de trastornos metabólicos**

30 Prioridad:

26.09.2011 US 201161539280 P

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

15.11.2018

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BOETTCHER, BRIAN R.;
CAPLAN, SHARI L.;
DANIELS, DOUGLAS S.;
HAMAMATSU, NORIO;
LICHT, STUART y
WELDON, STEPHEN CRAIG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 689 762 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 de fusión para el tratamiento de trastornos metabólicos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas proteínas de fusión que comprenden variantes del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), que se sabe que mejoran los perfiles metabólicos en los sujetos a quienes se administran.

Antecedentes de la invención

La familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) se caracteriza por 22 ligandos homólogos genéticamente distintos, los cuales se agrupan en siete subfamilias. El FGF-21 está más estrechamente relacionado con, y forma una subfamilia con, FGF-19 y FGF-23. Esta subfamilia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) regula diversos procesos fisiológicos no comunes en los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) clásicos, es decir, la homeostasia de la energía y del ácido biliar, el metabolismo de la glucosa y de lípidos, y la homeostasia de fosfato así como de vitamina D. Más aún, a diferencia de otros factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), esta subfamilia actúa de una forma endocrina. (Moore, D.D. (2007) Science 316, 1436-8) (Beenken y col. (2009) Nature Reviews Drug Discovery 8, 235).

El FGF21 es un polipéptido de 209 aminoácidos que contiene una secuencia líder de 28 aminoácidos (SEQ ID NO: 5). El FGF21 humano tiene aproximadamente el 79 % de identidad de aminoácidos con el FGF21 de ratón y aproximadamente el 80 % de identidad de aminoácidos con el FGF21 de rata. El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) se ha descrito como un tratamiento para vasculopatía isquémica, sanado de heridas, y enfermedades asociadas con la pérdida de función de las células pulmonares, bronquiales o alveolares. (Nishimura y colaboradores (2000) Biochimica et Biophysica Acta, 1492: 203-206; Publicación de Patente Número WO01/36640; y Publicación de Patente Número WO01/18172). Aunque el FGF-21 activa los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y las moléculas de señalización aguas abajo, incluyendo FRS2a y ERK, no se ha detectado una interacción directa de los FGFR y el FGF-21. Los estudios han identificado β -klotho, el cual se expresa altamente en el hígado, en los adipocitos y en el páncreas, como un determinante de la respuesta celular al FGF-21, y como un cofactor que media la señalización del FGF-21 a través de los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) (Kurosu, H. y col. (2007) J Biol Chem 282, 26687-95). El FGF21 es un potente agonista de los complejos de señalización de β -klotho FGFR1(IIIc), FGFR2(IIIc), y FGFR3(IIIc).

Se ha demostrado que el FGF-21 induce la absorción de glucosa independiente de insulina. También se demostró que el FGF-21 mitiga la hiperglucemia en una gama de modelos de roedores diabéticos. Además, se descubrió que los ratones transgénicos que sobreexpresan el FGF-21 son resistentes a las anomalías metabólicas inducidas por la dieta, y se demostró una reducción del peso corporal y de la masa de grasa, y mejoras en la sensibilidad a la insulina (Badman, M.K. y col. (2007) Cell Metab 5, 426-37). La administración del FGF-21 a primates no humanos diabéticos provocó una declinación en los niveles de glucosa, triglicéridos, insulina y glucagón en plasma en ayunas, y condujo a mejoras significativas en los perfiles de lipoproteínas, incluyendo un aumento de casi el 80 % en el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Kharitonov, A. y col. (2007) Endocrinology 148, 774-81). Los estudios recientes que investigan los mecanismos moleculares de la acción del FGF21 han identificado al FGF21 como una hormona endocrina importante que ayuda a controlar la adaptación al estado en ayunas. (Badman y col. (2009) Endocrinology 150, 4931) (Inagaki y col. (2007) Cell Metabolism 5, 415). Esto proporciona un vínculo previamente ausente aguas abajo de PPAR α , mediante el cual el hígado se comunica con el resto del cuerpo en la regulación de la biología de la homeostasia de la energía. (Galman y col. (2008) Cell Metabolism 8, 169) (Lundasen y col. (2007) Biochemical and Biophysical Research Communications 360, 437).

El FGF21 regula la homeostasia de los adipocitos a través de la activación de una ruta de AMPK/SIRT1/PGC1 para inhibir la expresión de PPAR γ y aumentar la función mitocondrial. (Chau y col. (2010) PNAS 107, 12553). El FGF21 también aumenta la absorción de la glucosa por parte del músculo esquelético, como se mide en los miotubos humanos cultivados y en el tejido de ratón aislado. El tratamiento con el FGF21 de las células de islotes de roedor conduce a una mejor función y supervivencia mediante la activación de las rutas de ERK1/2 y Akt. (Wente y col. (2006) Diabetes 55, 2470). El tratamiento con FGF21 también da como resultado una expresión genética alterada para la lipogénesis y las enzimas de oxidación de ácidos grasos en los hígados de roedor, probablemente mediante la señalización de HNF4 α y Foxa2.

Las proteínas de fusión de Fc mutantes específicas de FGF21 y su uso en el tratamiento de trastornos metabólicos se desvelan en los documentos WO2010129503 y WO2010129600.

Una dificultad asociada a la utilización del FGF-21 directamente como un producto bioterapéutico es que su vida media es muy corta. (Kharitonov, A. y col. (2005) Journal of Clinical Investigation 115: 1627-1635). En los

ratones, la vida media del FGF21 humano es de 0,5 a 1 hora, y en los monos cinomolgos, la vida media es de 2 a 3 horas. El FGF21 se puede utilizar como una formulación farmacéutica estéril de múltiples usos. Sin embargo, se ha determinado que los conservantes, es decir, m-cresol, tienen un efecto adverso sobre su estabilidad en estas condiciones. En el desarrollo de una proteína de FGF21 para su uso como un producto terapéutico en el tratamiento de diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2 y otras condiciones metabólicas, sería deseable un aumento en la vida media y en la estabilidad. Las proteínas de FGF21 que tengan una mejor vida media y estabilidad permitirían administrar una dosificación menos frecuente a los pacientes a quienes se administre la proteína. Claramente, existe una necesidad de desarrollar una formulación acuosa de proteína estable para la proteína terapéutica de FGF21.

Adicionalmente, un desafío significativo en el desarrollo del FGF21 como un producto farmacéutico de proteína, es lidiar con sus inestabilidades físicas y químicas. La variedad de composición y las características de las proteínas definen comportamientos específicos, tales como pliegue, estabilidad conformacional, y despliegue/desnaturalización. Se debe referir a estas características cuando se tenga como objetivo la estabilización de las proteínas en el curso de desarrollar las condiciones de la formulación farmacéutica utilizando soluciones acuosas de proteínas (Wang, W., Int. J. of Pharmaceutics, 18, (1999)). Un efecto deseado de la estabilización de las proteínas terapéuticas de interés, por ejemplo, las proteínas de la presente invención, es aumentar la resistencia a la proteólisis y a la degradación enzimática, mejorando de esta manera la estabilidad de la proteína y reduciendo la acumulación de proteína.

Sumario de la invención

La invención se refiere a la identificación de nuevas proteínas de fusión, las cuales comprenden variantes del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), y las cuales tienen propiedades farmacéuticas mejoradas sobre el FGF21 de tipo silvestre bajo las condiciones de la formulación farmacéutica, por ejemplo, son más estables, poseen la capacidad para mejorar los parámetros metabólicos para los sujetos a quienes se administran, son menos susceptibles a la proteólisis y a la degradación enzimática, y tienen menos probabilidades de acumularse y de formar complejos. Las proteínas de fusión de la invención se desvelan en la tabla de la reivindicación 1.

Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden utilizar como un producto inyectable una vez por semana ya sea solo o bien en combinación con agentes anti-diabéticos orales que mejorarán el control glucémico, el peso corporal, y el perfil de lípidos de los pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2. Las proteínas también se pueden utilizar para el tratamiento de obesidad o de otras afecciones asociadas con el FGF21.

Las proteínas de fusión de la invención superan los obstáculos significativos de las inestabilidades físicas asociadas con los productos terapéuticos de proteínas, incluyendo, por ejemplo, la administración del FGF21 de tipo silvestre, mediante la presentación de proteínas, las cuales son más estables, menos susceptibles a la proteólisis y a la degradación enzimática, y las cuales tienen menos probabilidades de acumularse y formar complejos, que el FGF21 de tipo silvestre, bajo las condiciones de la formulación farmacéutica.

En un primer aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende una variante del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) y una región Fc tal como se define en las secuencias incluidas en la tabla de la reivindicación 1. Las secuencias de FGF21 incluidas en la tabla de la reivindicación 1 son variantes de la secuencia de FGF21 de tipo silvestre, por ejemplo, la secuencia de FGF21 de tipo silvestre con el número de referencia de NCBI NP_061986.1, y encontrada en las patentes expedidas como, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,716,626B1, cedida a Chiron Corporation.

Otras realizaciones se refieren a los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la invención, a un vector que contiene estos polinucleótidos, y a una célula hospedadora portadora de dicho vector.

En el presente documento se proporcionan procedimientos empleados para generar las proteínas de fusión de la invención, en donde estos procedimientos implican la modificación de la proteína de FGF21 de tipo silvestre, mediante, por ejemplo, la incorporación específica del sitio de aminoácidos en las posiciones de interés dentro de la proteína de FGF21 de tipo silvestre, así como la fusión entre la porción variante de FGF21 de la molécula con la región Fc. Estas modificaciones y fusiones mejoran las propiedades biológicas de las proteínas de fusión de la invención en relación con las versiones de tipo silvestre de las proteínas, así como, en algunos casos, sirven como puntos de unión, por ejemplo, para marcadores y agentes de extensión de la vida media de la proteína, y para los propósitos de fijar estas variantes a la superficie de un soporte sólido. Las realizaciones relacionadas de la invención son procedimientos para producir células capaces de producir dichas proteínas de la invención, y de producir vectores que contienen el ADN que codifica estas variantes y fusiones.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de la invención desveladas en el presente documento se pueden unir covalentemente a uno o más polímeros, tales como polietilenglicol (PEG) o poliácido siálico, ya sea en la posición de las modificaciones de aminoácidos específicas del sitio hechas en relación con el FGF21 de tipo silvestre, o bien en la posición de aminoácidos comúnmente compartida con las versiones de tipo silvestre de esas

proteínas. El grupo PEG se une de tal manera que mejora, y/o no interfiere con, la función biológica de las porciones constitutivas de las proteínas de fusión de la invención, por ejemplo, las variantes de proteína de FGF21. Las variantes de FGF21 se fusionan con una secuencia, la región Fc, por medio de un enlazador, tal como GS o GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6), tal como se define en la tabla de la reivindicación 1. Tales proteínas de fusión que se desvelan en el presente documento también pueden formar multímeros.

En la proteína de fusión de acuerdo con la invención, la secuencia de aminoácidos heteróloga, Fc, se fusiona con el extremo amino terminal de las proteínas de fusión.

En otra realización más, las proteínas de fusión son para su uso en el tratamiento de trastornos asociados con el FGF21, tales como obesidad, diabetes mellitus de tipo 2, diabetes mellitus de tipo 1, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, infarto de miocardio agudo, hipertensión, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, enfermedad de arterias periféricas, ictus, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad renal, complicaciones diabéticas, neuropatía, gastroparesis y los trastornos asociados con las mutaciones inactivadoras en el receptor de insulina, los cuales comprenden administrar al paciente que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más proteínas de la invención, o una composición farmacéutica de las mismas.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión de la invención tal como se define en la tabla de la reivindicación 1 que se desvelan en el presente documento, y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico y el uso comprende administrar a un paciente humano que lo necesite, una composición farmacéutica de la invención. Los ejemplos no limitantes de los trastornos metabólicos que se pueden tratar incluyen diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2, y obesidad.

Estos y otros aspectos de la invención serán elucidados en la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A a 1D** muestran que el V188 tiene una mayor eficacia en el modelo de ratón diabético ob/ob sobre el V76. El V188 muestra resultados superiores cuando se administra en 1 miligramo por kilogramo (mpk), en comparación con los 5 miligramos por kilogramo (mpk) en que se administró el V76. La Figura 1A muestra la glucosa en plasma con alimento como una lectura (los círculos representan el vehículo (PBS - suero regulado con fosfato), los cuadros representan el V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y los triángulos representan el V188 en 1 miligramo por kilogramo (mpk). La Figura 1B muestra la insulina en plasma con alimento como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y V188 en 1 miligramo por kilogramo (mpk)). La Figura 1C muestra el peso corporal como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y V188 en 1 miligramo por kilogramo (mpk)). La Figura 1D muestra el contenido de lípido en hígado como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y V188 en 1 miligramo por kilogramo (mpk)).

Las **Figuras 2A a 2D** muestran que el V101 tiene una mayor eficacia en el modelo de ratón diabético ob/ob sobre el V76. El V101 muestra resultados superiores cuando se administra en 1 miligramo por kilogramo (mpk), en comparación con los 5 miligramos por kilogramo en los que se administró el V76. La **Figura 2A** muestra la glucosa en plasma con alimento como una lectura (los círculos representan el vehículo (PBS - solución salina tamponada con fosfato), los cuadros representan el V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y los triángulos representan el V101 en 1 miligramo por kilogramo (mpk). La **Figura 2B** muestra la insulina en plasma con alimento como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y V101 en 1 miligramo por kilogramo (mpk)). La **Figura 2C** muestra el peso corporal como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y V101 en 1 miligramo por kilogramo (mpk)).

La **Figura 2D** muestra el contenido de lípido en hígado como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y V101 en 1 miligramo por kilogramo (mpk)).

Las **Figuras 3A a 3D** muestran que el V103 tiene una mayor eficacia en el modelo de ratón diabético ob/ob sobre el V76. El V103 muestra resultados superiores cuando se administra en 1 miligramo por kilogramo (mpk), en comparación con los 5 miligramos por kilogramo en los que se administró el V76. La **Figura 3A** muestra la glucosa en plasma con alimento como una lectura (los círculos representan el vehículo (PBS - solución salina tamponada con fosfato), los cuadros representan el V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y los triángulos representan el V103 en 1 miligramo por kilogramo (mpk). La **Figura 3B** muestra la insulina en plasma con alimento como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y V103 en 1 miligramo por kilogramo (mpk)). La **Figura 3C** muestra el peso corporal como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y V103 en 1 miligramo por kilogramo (mpk)). La **Figura 3D** muestra el contenido de lípido en hígado como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk), y V103 en 1 miligramo por kilogramo (mpk)).

Las **Figuras 4A a 4D** demuestran la farmacocinética superior y las propiedades termodinámicas poseídas por las proteínas de fusión de la invención sobre las proteínas de fusión de FGF21 en la técnica. La **Figura 4A** muestra las

concentraciones en plasma de las proteínas de fusión de la invención en la Publicación Internacional del TCP Número WO10/129600 descritas como Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G), y Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E), en seguida de la inyección intravenosa (i.v.) de dicha fusión en los ratones. La **Figura 4B** muestra las propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión de la invención (V101, V103 y V188) después de una sola dosis intravenosa (i.v.) en el ratón, como se ensaya mediante el ELISA anti-Fc, comparándose con los datos farmacocinéticos generados en el ratón para el V76 en un estudio previo utilizando un ELISA de anticuerpo anti-FGF21. La **Figura 4C** muestra una verificación de transferencia de las proteínas de fusión de la invención en un análisis por transferencia de Western anti-FGF21, de una manera consistente con los datos del ELISA anti-Fc a las 120 horas y 15 días. Las muestras de la transferencia son como sigue: A representa V101, B representa V103, y C representa V188. El control es V101 y suero. La **Figura 4D** demuestra la estabilidad termodinámica significativamente incrementada de las proteínas de fusión de la invención, comparándose con el V76. Desde arriba hacia abajo, la Figura representa V101, V103, y V188, todos los cuales tienen mejores temperaturas de fusión (T_m) comparándose con el V76 ($T_m < 50^\circ\text{C}$ (no se muestra)) y con el FGF21 de tipo silvestre ($T_m = 46,5^\circ\text{C} \pm 0,3$ (no se muestra)).

Descripción detallada de la invención

Las proteínas de fusión de la presente invención representan las versiones modificadas del polipéptido de FGF21 de tipo silvestre de longitud completa, como se conoce en la materia. La secuencia de FGF21 de tipo silvestre servirá como una secuencia de referencia (SEQ ID NO: 1), por ejemplo, cuando es necesario hacer comparaciones entre la secuencia de FGF21 de tipo silvestre y las variantes de proteína. La secuencia de FGF21 de tipo silvestre tiene el Número de Secuencia de Referencia de NCBI NP_061986.1, y se puede encontrar en las patentes expedidas como, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º US 6.716.626B1, cedida a Chiron Corporation (SEQ ID NO: 1).

```

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

145          150          155          160
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
          165          170          175
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
          180          185          190
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
          195          200          205
Ser
209

```

La secuencia de ARNm correspondiente que codifica el polipéptido de FGF21 de longitud completa (número de secuencia de referencia del NCBI NM_0191 13.2) se muestra a continuación (SEQ ID NO: 2):

```

1  ctgtcagctg aggatccagc cgaaagagga gccaggcact caggccacct gagtctactc
61  acctggacaa ctggaatctg gcaccaattc taaaccactc agcttctccg agctcacacc
121 cccgagatca cctgaggacc cgagccattg atggactcgg acgagaccgg gttcagacac
181 tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt cttctgctgg gagcctgccg ggcacacccc
241 atccctgact ccagtctctt cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac
301 acagatgatg cccagcagac agaagccac ctggagatca gggaggatgg gacgggtggg
361 ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt
421 attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg ttctgtgccc agcggccaga tggggccctg
481 tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac
541 ggatacaatg tttaccagtc cgaagccac ggcctcccgc tgcacctgcc agggaacaag
601 tccccacacc gggacctgc accccgagga ccagctcgt tctgcccact accaggcctg
661 cccccgcac tcccggagcc acccggaatc ctggccccc agcccccca tgtgggctcc
721 tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc cagggccgaa gcccagcta cgttctctga
781 agccagagggc tgtttactat gacatctcct ctttatttat taggttattt atcttattta
841 tttttttatt tttcttactt gagataataa agagttccag aggagaaaaa aaaaaaaaaa
901 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

La secuencia de FGF21 madura carece de una secuencia líder y también puede incluir otras modificaciones de un polipéptido, tal como el procesamiento proteolítico del extremo amino terminal (con o sin una secuencia líder) y/o del extremo carboxilo terminal, la disociación de un polipéptido más pequeño a partir de un precursor más grande, la glicosilación N-enlazada y/u O-enlazada, y otras modificaciones postraduccionales entendidas por los expertos en la materia. Un ejemplo representativo de una secuencia de FGF21 madura tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 3, la cual representa las posiciones de aminoácidos 29-209 de la secuencia de la proteína de FGF21 de longitud completa (número de secuencia de referencia del NCBI NP_061986.1)):

```

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
      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

```

La secuencia de ADNc correspondiente que codifica el polipéptido de FGF21 maduro (SEQ ID NO: 3) se muestra a continuación (SEQ ID NO: 4):

```

1  caccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccagtccg gcagcggtag
61 ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gccacctgg agatcaggga ggatgggacg
121 gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg
181 ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg
240 gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttcggga gctgcttctt
301 gaggacggat acaatgttta ccagtcgaa gccacggcc tccgctgca cctgccaggg
360 aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctgcttctt gccactacca
421 ggctgcccc ccgactccc ggagccaccc ggaatcctgg ccccccagcc cccgatgtg
481 ggctcctcgg accctctgag catggtggga cttcccagg gccgaagccc cagctacgct
541 tcctga

```

Las proteínas de fusión de la invención comprenden las variantes de FGF21, tal como se definen en la tabla de la reivindicación 1. Tal como se usan en el presente documento, los términos "variante de proteína", "variante humana", "variante de polipéptido o de proteína", "variante", "mutante", así como cualesquiera términos similares o versiones específicas de los mismos (por ejemplo, "variante de proteína de FGF21", "variante", "mutante de FGF21", etc.), definen las secuencias de proteínas o de polipéptidos que comprenden modificaciones, truncamientos, u otras variantes de las contrapartes de proteínas o de polipéptidos de origen natural (es decir, de tipo silvestre), o las secuencias naturales correspondientes. "Variante de FGF21" o "mutante de FGF21", por ejemplo, se describen en relación con la proteína de FGF21 de tipo silvestre (es decir, de origen natural), tal como se describen en el presente documento.

Las secuencias de proteínas de fusión de la invención se incluyen en la tabla de la reivindicación 1. Las descripciones de estas fusiones incluyen la variante de FGF21, un enlazador y la región de Fc. Los cambios o las sustituciones empleadas por la variante de FGF21 se numeran y se describen en relación con el FGF21 de tipo silvestre. A modo de ejemplo, la "variante 101 (V101)" (SEQ ID NO: 10) es una fusión de Fc-FGF21 con un enlazador de dos aminoácidos y las siguientes sustituciones hechas en relación con el FGF21 de tipo silvestre: Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, P174L, S195A, P199G, G202A.

En la Tabla 1, a continuación, las secuencias 10, 11, 12 y 13 son proteínas de fusión de acuerdo con la invención. Las secuencias 7, 8, 9 se desvelan con fines comparativos.

Tabla 1

Proteínas de fusión de Fc Variante de FGF21

SEQ ID NO:	Secuencia	Nombre
7	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH ALHNHYTQKS LSLSPGKGSD SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD AQQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGLYGS LHFDPACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPGNKSPH RDPAPRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LSMVGPSQGR SPSYAS	Fusión-Fc N-Terminal de Longitud Completa con Enlazador de 2 Aminoácidos (GS) y FGF21 de Tipo Silvestre

SEQ ID NO:	Secuencia	Nombre
8	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGGG</u> <u>GSGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDAQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPD GAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS	Fusión-Fc N-Terminal de Longitud Completa con Enlazador de 15 Aminoácidos (GGGS x 3) entre Fc y FGF21 de Tipo Silvestre
9	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA QPPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Variante #76 = Proteína con un total de 9 mutaciones en relación con FGF21 de Tipo Silvestre (como en la WO01/018172)
10	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGSD</u> SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGTLYGS LHFDPEACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LAMVGGSQAR SPSYAS	Variante # 101 = Fusión-Fc N- terminal con Enlazador de 2 Aminoácidos (GS) entre Fc y FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
11	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGSD</u> SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QKPDGALYGS LHFDPEACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LAMVGGSQAR SPSYAS	Variante # 103 = Fusión-Fc N- terminal con Enlazador de 2 Aminoácidos (GS) = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

SEQ ID NO:	Secuencia	Nombre
12	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQKPDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPCNR SPHRDPA ^S RG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGGG QARSPSYAS	Variante #188 = V103 con Enlazador de 15 Aminoácidos (GGGG x 3) entre Fc y FGF21 = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
13	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGT ^L YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPCNR SPHRDPA ^S RG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGGG QARSPSYAS	Variante #204 = V101 con Enlazador de 15 Aminoácidos (GGGG x 3) entre Fc y FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
* Obsérvese que la secuencia de FGF21 de tipo silvestre en esta tabla se refiere al Número de Secuencia de Referencia de NCBI NP_061986.1 (SEQ ID NO: 1) a menos que se especifique de otra manera. Todas las mutaciones en la fracción de FGF21 y la numeración de aminoácidos correspondiente de dichas mutaciones se refieren de regreso a la (SEQ ID NO: 1), y no a las secuencias de longitud completa de esta tabla, las cuales también pueden incluir Fc y regiones enlazadoras.		

Las variantes o los mutantes utilizados en las proteínas de fusión de la invención, por ejemplo, las variantes de FGF21 de tipo silvestre, son tal como se dan en las secuencias 10-13. Hablando en términos generales, una variante posee alguna propiedad estructural o funcional modificada de la proteína de tipo silvestre. Por ejemplo, la variante puede tener una mejor o mayor estabilidad física en soluciones concentradas (por ejemplo, acumulación mediada menos hidrofóbica), una mejor o mayor estabilidad en plasma cuando se incuba con el plasma sanguíneo, o mejor o mayor bioactividad mientras que se mantiene un perfil de bioactividad favorable.

Las sustituciones y modificaciones de aminoácidos aceptables que constituyen diferencias entre las porciones de las proteínas de fusión de la invención y sus proteínas comparadoras de tipo silvestre son las enumeradas para las secuencias 10-13 en la Tabla 1.

Un experto en la materia de la expresión de las proteínas reconocerá que se puede introducir metionina o la secuencia de metionina-arginina en el extremo N-terminal de cualquiera de las proteínas de fusión de la invención, para la expresión en *E. coli*, y se contemplan dentro del ámbito de la presente invención.

Las proteínas de fusión de la invención pueden poseer una mayor compatibilidad con los conservantes farmacéuticos (por ejemplo, m-cresol, fenol, alcohol bencílico), haciendo posible, por consiguiente, la preparación de una formulación farmacéutica conservada que mantenga las propiedades físico-químicas y la actividad biológica de

la proteína durante su almacenamiento. De acuerdo con lo anterior, las variantes con una mejor estabilidad farmacéutica en relación con el tipo silvestre, tienen una mayor estabilidad física en soluciones concentradas en condiciones tanto fisiológicas como conservadas de la formulación farmacéutica, mientras que se mantiene la potencia biológica. A modo de ejemplo no limitante, las proteínas de fusión de la invención pueden ser más resistentes a la proteólisis y a la degradación enzimática; pueden tener una mayor estabilidad; y pueden tener menos probabilidades de acumularse, que sus contrapartes de tipo silvestre o que la secuencia natural correspondiente. Tal como se utilizan en el presente documento, estos términos no son mutuamente exclusivos o limitantes, siendo enteramente posible que una variante dada tenga una o más propiedades modificadas de la proteína de tipo silvestre.

La invención también abarca moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de la invención tal como se definen en la tabla de la reivindicación 1.

En el presente documento se proporcionan procedimientos empleados para generar las proteínas de fusión de la invención, en donde estos procedimientos implican la modificación específica del sitio y la modificación no específica del sitio de las versiones de tipo silvestre de las proteínas (por ejemplo, la proteína de FGF21 de tipo silvestre, tal como se describe en el presente documento), por ejemplo, truncamientos de las proteínas de tipo silvestre, y la incorporación específica del sitio de los aminoácidos en las posiciones de interés dentro de las proteínas de tipo silvestre. Estas modificaciones mejoran las propiedades biológicas de las proteínas de fusión de la invención en relación con las proteínas de tipo silvestre, así como, en algunos casos, sirven como puntos de unión, por ejemplo, para marcadores y agentes de extensión de la vida media de la proteína, y para los propósitos de fijar estas variantes a la superficie de un soporte sólido. Las realizaciones relacionadas de la invención son los procedimientos para producir células capaces de producir dichas proteínas de fusión de la invención, y de producir vectores que contengan el ADN que codifique estas variantes.

En ciertas realizaciones, estas modificaciones, por ejemplo, las modificaciones específicas del sitio, se utilizan para unir conjugados, por ejemplo, grupos PEG, a proteínas de la invención, para los propósitos de, por ejemplo, extender la vida media o mejorar de otra manera las propiedades biológicas de dichas proteínas. Estas técnicas se describen adicionalmente en el presente documento.

En otras realizaciones, estas modificaciones, por ejemplo, las modificaciones específicas del sitio, se utilizan para unir otros polímeros, moléculas pequeñas y secuencias de proteínas recombinantes que extiendan la vida media de la proteína de la invención. Esta realización incluye la unión de ácidos grasos o compuestos de enlace de albúmina específicos a proteínas. En otras realizaciones, las modificaciones se hacen en un tipo de aminoácido particular, y se pueden unir en uno o más sitios sobre la proteína.

En otras realizaciones, estas modificaciones, por ejemplo, las modificaciones específicas del sitio, se utilizan como un medio de unión para la producción de multímeros de tipo silvestre y/o variantes, por ejemplo, dímeros (homodímeros o heterodímeros) o trímeros o tetrámeros. Estas moléculas de proteína multiméricas pueden tener adicionalmente grupos, tales como PEG, azúcares, y/o conjugados de PEG-colesterol unidos.

En otras realizaciones, estas modificaciones específicas del sitio se utilizan para reticular específicamente en el sitio las proteínas formando de esta manera heterooligómeros, incluyendo, pero sin limitación, heterodímeros y heterotrímeros. En otras realizaciones, estas modificaciones específicas del sitio se utilizan para reticular específicamente en el sitio las proteínas formando de esta manera conjugados de proteína-proteína, conjugados de proteína-polipéptido, conjugados de proteína-péptido. En otras realizaciones, una modificación específica del sitio puede incluir un punto de ramificación para permitir que se una más de un tipo de molécula en un solo sitio de una proteína.

En otras realizaciones, las modificaciones incluidas en el presente documento se pueden hacer de una manera no específica del sitio y dan como resultado conjugados de proteína-proteína, conjugados de proteína-polipéptido, conjugados de proteína-péptido de la invención.

Definiciones

Se utilizan diferentes definiciones a través de todo el presente documento. La mayoría de las palabras tienen el significado que se atribuiría a estas palabras por un experto en la materia. Las palabras definidas de una manera específica, ya sea más adelante o bien en cualquier otra parte de este documento, tienen el significado proporcionado en el ámbito de la presente invención como un todo y como son típicamente entendidas por los expertos en la materia.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "FGF21" se refiere a un miembro de la familia de las proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Una secuencia de aminoácidos del FGF21 (Número de referencia de GenBank NP_061986.1) se establece como la SEQ ID NO: 1, cuya secuencia de polinucleótidos

correspondiente se establece como la SEQ ID NO: 2 (número de secuencia de referencia del NCBI NM_019113.2). "Variante de FGF21", "mutante de FGF21", y términos similares describen la versión modificada de la proteína de FGF21, por ejemplo, con los restos de aminoácidos constitutivos delecionados, adicionados, modificados, o sustituidos.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "receptor de FGF21" se refiere a un receptor para FGF21 (Kharitonov, A y col. (2008) Journal of Cellular Physiology 215: 1-7; Kurosu, H y col. (2007) JBC 282: 26687-26695; Ogawa, Y y col. (2007) PNAS 104: 7432-7437).

10 El término "polipéptido de FGF21" se refiere a un polipéptido que se expresa de forma natural en los seres humanos. Para los propósitos de la presente divulgación, el término "polipéptido de FGF21" se puede utilizar de una manera intercambiable para referirse a cualquier polipéptido de FGF21 de longitud completa, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, la cual consiste en 209 restos de aminoácidos y la cual está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2; cualquier forma del polipéptido maduro, el cual consiste en 181 restos de aminoácidos, y en donde se han removido los 28 restos de aminoácidos en el extremo amino-terminal del polipéptido de FGF21 de longitud completa (es decir, los que constituyen el péptido señal).

- 15 "Variante 76", tal como se utiliza en el presente documento, es una variante de proteína de FGF21, que proporciona un PEG ramificado de 40 kDa enlazado a través de Cys154, y ocho mutaciones puntuales en relación con la proteína de tipo silvestre de 177 aminoácidos. La síntesis de la variante se describe con mayor detalle en el presente documento, y la secuencia de la proteína se representa en la Tabla 1 y en la SEQ ID NO: 9.

20 La expresión "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico de la presente invención que: (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 % de las proteínas, lípidos, carbohidratos, u otros materiales con los que se encuentra naturalmente cuando se aísla el ácido nucleico total a partir de las células fuente, (2) no está enlazada a todo o a una parte de un polinucleótido con el que se enlaza la "molécula de ácido nucleico aislada" en la naturaleza, (3) está enlazada operativamente a un polinucleótido con el que no está enlazada en la naturaleza, o (4) no se presenta en la naturaleza como parte de una secuencia de polinucleótido más grande.

25 Preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención está sustancialmente libre de cualquier otra molécula de ácidos nucleicos contaminantes o de otros contaminantes que se encuentren en su medio ambiente natural, que interferirían con su uso en la producción del polipéptido o con su uso terapéutico, de diagnóstico, profiláctico o en investigación.

- 30 El término "vector" se utiliza para referirse a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido, o virus) utilizada para transferir la información de codificación a una célula hospedadora.

El término "vector de expresión" se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula hospedadora y contiene secuencias de ácidos nucleicos que dirigen y/o controlan la expresión de secuencias de ácidos nucleicos heterólogas insertadas. La expresión incluye, pero sin limitación, procesos, tales como la transcripción, la traducción, y el corte y empalme de ARN, si hay intrones presentes.

- 35 El término "operativamente enlazada" se utiliza en el presente documento para referirse a una configuración de las secuencias flanqueantes, en la que las secuencias flanqueantes así descritas se configuran o se ensamblan para llevar a cabo su función usual. Los elementos de las proteínas de fusión se pueden enlazar operativamente entre sí para permitir que funcione la proteína de fusión como si fuera una proteína endógena de origen natural, y/o para combinar distintos elementos de dichas proteínas de fusión de forma sinérgica.

- 40 A nivel de los nucleótidos, una secuencia flanqueante enlazada operativamente a una secuencia codificante puede ser capaz de efectuar la replicación, transcripción y/o traducción de la secuencia codificante. Por ejemplo, una secuencia codificante se enlaza operativamente a un promotor cuando el promotor es capaz de dirigir la transcripción de esa secuencia codificante. Una secuencia flanqueante no necesita estar contigua a la secuencia codificante, siempre que funcione correctamente. Por consiguiente, por ejemplo, puede haber presentes secuencias
- 45 de intervención no traducidas y no obstante transcritas entre una secuencia promotora y la secuencia codificante, y la secuencia promotora todavía se puede considerar como "operativamente enlazada" a la secuencia codificante.

- El término "célula hospedadora" se utiliza para referirse a una célula que se ha transformado, o que es capaz de transformarse con una secuencia de ácido nucleico y luego de expresar un gen de interés seleccionado. El término incluye la progenie de la célula progenitora, ya sea que la progenie sea o no idéntica en su morfología o en su elaboración genética al progenitor original, siempre que esté presente el gen seleccionado.
- 50

El término "aminoácido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a los aminoácidos que se presentan de forma natural, a los aminoácidos no naturales, a los análogos de aminoácidos, y a los miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se presentan de forma natural, todos en sus estereoisómeros D y L si su estructura permite tales formas estereoisoméricas. Los aminoácidos se citan en el

presente documento ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos, o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura bioquímica IUPAC-IUB.

La expresión "que se presenta de forma natural", cuando se utiliza en relación con los materiales biológicos, tales como moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos, células hospedadoras y similares, se refiere a los materiales que se encuentran en la naturaleza, y no son manipulados por el hombre. De una manera similar, "que no se presentan de forma natural", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un material que no se da en la naturaleza, o que se ha modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre. Cuando se utiliza en relación con los nucleótidos, el término "que se presenta en la naturaleza" se refiere a las bases de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), y uracilo (U). Cuando se utiliza en relación con los aminoácidos, el término "que se presenta en la naturaleza" se refiere a los 20 aminoácidos convencionales (es decir, alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptófano (W), y tirosina (Y)), así como selenocisteína, pirrolisina (Pyl, u O), y pirrolina-carboxi-lisina (Pcl, o Z).

La pirrolisina (Pyl) es un aminoácido que se encuentra en la naturaleza dentro de las metiltransferasas de metilamina de las arqueas metanogénicas de la familia de *Methanosarcina*. La pirrolisina es un análogo de lisina cotraduccionalmente incorporado en los codones UAG dentro del marco en el respectivo ARNm, y se considera como el 22º aminoácido natural.

Tal como se describe al menos en la Publicación de Patente del TCP Número WO2010/48582 (solicitante: IRM, LLC), los intentos por biosintetizar la pirrolisina (Pyl) en *E. coli* dieron como resultado la formación de una "pirrolisina desmetilada", citada en el presente documento como pirrolinacarboxilisina, o Pcl. "Pcl", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquiera de Pcl-A o Pcl-B.

Las expresiones "aminoácido no natural" y "aminoácido innatural", tal como se utilizan en el presente documento, pretenden representar, de una manera intercambiable, las estructuras de aminoácidos que no se pueden generar de manera biosintética en ningún organismo utilizando genes no modificados o modificados a partir de cualquier organismo, ya sea igual o diferente. Los términos se refieren a un resto de aminoácido que no está presente en la secuencia de proteína de FGF21 que se da de forma natural (de tipo silvestre) o en las secuencias de la presente invención. Éstos incluyen, pero sin limitación, aminoácidos modificados y/o análogos de aminoácidos que no son uno de los 20 aminoácidos que se dan en la naturaleza, selenocisteína, pirrolisina (Pyl), o pirrolinacarboxilisina (Pcl, por ejemplo, tal como se describe en la Publicación de Patente del TCP N.º WO2010/48582). Estos restos de aminoácidos no naturales se pueden introducir mediante la sustitución de los aminoácidos que se dan en la naturaleza y/o mediante la inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia de proteína de FGF21 que se da en la naturaleza (de tipo silvestre) o en las secuencias de la invención. El resto de aminoácido no natural también se puede incorporar de tal manera que se imparta una funcionalidad deseada a la molécula de FGF21, por ejemplo, la capacidad para enlazarse a una fracción funcional (por ejemplo, PEG). Cuando se utilice en relación con aminoácidos, el símbolo "U" significará "aminoácido no natural" y "aminoácido innatural", tal como se utiliza en el presente documento.

Además, se entiende que estos "aminoácidos no naturales" requieren un ARNt modificado y de una sintetasa de ARNt modificado (RS) para su incorporación en una proteína. Estos pares de ARNt/RS ortogonales "seleccionados" se generan mediante un proceso de selección, tal como el desarrollado por Schultz y col., o mediante mutación aleatoria o dirigida. A modo de ejemplo, la pirrolinacarboxilisina es un "aminoácido natural", ya que se genera de forma biosintética mediante los genes transferidos a partir de un organismo hasta las células hospedadoras, y ya que se incorpora en las proteínas utilizando genes de ARNt natural y sintetasa de ARNt, mientras que la *p*-amino-fenilalanina (véase, Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc., 29 de enero de 2003; 125(4): 935-9) es un "aminoácido no natural" debido a que, aunque se genera de forma biosintética, se incorpora en las proteínas mediante un par de sintetasa de ARNt/ARNt ortogonal "seleccionado".

Los aminoácidos codificados modificados incluyen, pero sin limitación, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, O-fosfoserina, ácido azetidincarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminoipimélico, terbutilglicina, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-metilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alohidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, aloisoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentilglicina, ácido piperídico y tioprolina. El término "aminoácido" también incluye los aminoácidos que se dan de forma natural que son metabolitos en ciertos organismos pero que no están codificados por el código genético para su incorporación en las proteínas. Estos aminoácidos incluyen, pero sin limitación, ornitina, D-ornitina, y D-arginina.

- El término "análogo de aminoácido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se da en la naturaleza, a modo de ejemplo solamente, un carbono- α que se enlaza a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R. Los análogos de aminoácidos incluyen los aminoácidos naturales y no naturales que se bloquean químicamente, de una manera reversible o irreversible, o se modifica químicamente su grupo carboxilo C-terminal, su grupo amino N-terminal y/o sus grupos funcionales de cadena lateral. Estos análogos incluyen, pero sin limitación, sulfóxido de metionina, metionina-sulfona, S-(carboxi-metil)-cisteína, sulfóxido de S-(carboxi-metil)-cisteína, S-(carboxi-metil)-cisteína-sulfona, (beta-metil-éster) de ácido aspártico, N-etil-glicina, alanina-carboxamida, homoserina, norleucina, y metionina-metilsulfonio.
- El término "miméticos de aminoácidos", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a los compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a la de un aminoácido que se da en la naturaleza.
- El término "variante biológicamente activa" se refiere a cualquier variante de polipéptido utilizada en las proteínas de fusión de la invención, por ejemplo, como una proteína constituyente de las fusiones, que posee una actividad de su contraparte de proteína o polipéptido de tipo silvestre (por ejemplo, de origen natural), tal como la capacidad para modular los niveles de glucosa, HbA1c, insulina, triglicéridos, o colesterol en sangre; incrementar la función pancreática; reducir los niveles de lípidos en el hígado; reducir el peso corporal; y para mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto de energía, o la sensibilidad a la insulina, independientemente del tipo o número de modificaciones que se hayan introducido en la variante del polipéptido. No obstante, las variantes de polipéptidos que poseen un nivel un poco disminuido de actividad en relación con sus versiones de tipo silvestre se pueden considerar como variantes de polipéptidos biológicamente activas. Una variante de polipéptido biológicamente activa de la invención es una variante de FGF21, la cual se modifica después, y posee propiedades biológicas similares o mejoradas en relación con el FGF21 de tipo silvestre.
- Las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz", se refieren cada una a la cantidad de una proteína de fusión de la invención utilizada para soportar un nivel observable de una o más actividades biológicas de las contrapartes del polipéptido o de la proteína de tipo silvestre, tales como la capacidad para reducir los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos o colesterol en sangre; reducir los niveles de triglicéridos o de lípidos en el hígado; reducir el peso corporal; o mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto de energía, o la sensibilidad a la insulina. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" administrada a un paciente que presente, padezca, o que sea susceptible a padecer, los trastornos asociados con el FGF21 (tales como diabetes mellitus de tipo 1 o de tipo 2, obesidad, o síndrome metabólico), es una cantidad que induzca, mitigue, o provoque de otra modo una mejora en los síntomas patológicos, en el progreso de la enfermedad, en las condiciones fisiológicas asociadas con, o en la resistencia a sucumbir a, los trastornos anteriormente mencionados. Para los propósitos de la presente invención, un "sujeto" o "paciente" preferentemente es un ser humano, pero también puede ser un animal, de una manera más específica, un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos, y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, y similares), y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, y similares).
- El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más materiales de formulación adecuados para llevar a cabo o para mejorar el suministro de una proteína de fusión de la invención.
- El término "antígeno" se refiere a una molécula o a una parte de una molécula que es capaz de enlazarse mediante un anticuerpo, y adicionalmente que es capaz de utilizarse en un animal para producir anticuerpos que son capaces de enlazarse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.
- El término "Fc natural" se refiere a una molécula o a una secuencia que comprende la secuencia de un fragmento que no se enlaza al antígeno resultante de la digestión del anticuerpo entero o producido por otros medios, ya sea en una forma monomérica o multimérica, y puede contener la región de articulación. La fuente de inmunoglobulina original del Fc natural es preferentemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren IgG1 e IgG2. Las moléculas de Fc naturales se forman de polipéptidos monoméricos que se pueden enlazar en formas dimericas o multiméricas mediante una asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de las moléculas de Fc naturales está en el intervalo de 1 a 4, dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, e IgE) o de la subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, e IgGA2). Un ejemplo de un Fc natural es un dímero enlazado con disulfuro resultante de la digestión con papaína de una IgG (véase Ellison y col., 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). El término "Fc natural", tal como se utiliza en el presente documento, es genérico para las formas monoméricas, dimericas, y multiméricas.
- El término "variante de Fc" se refiere a una molécula o a una secuencia que se modifica a partir de un Fc natural pero todavía comprende un sitio de enlace para el receptor de salvamento, FcRn (receptor de Fc neonatal). Las Publicaciones Internacionales N.º WO 97/34631 y WO 96/32478 describen las variantes de Fc de ejemplo, así como la interacción con el receptor de salvamento. Por consiguiente, el término "variante de Fc" puede comprender una

molécula o una secuencia que se humaniza a partir de un Fc natural no humano. Adicionalmente, un Fc natural comprende regiones que se pueden remover debido a que proporcionan características estructurales o una actividad biológica que no se requieren para las moléculas de fusión de las proteínas de fusión de la invención. Por consiguiente, el término "variante de Fc" comprende una molécula o una secuencia que carece de uno o más sitios o restos de Fc naturales, o en donde se han modificado uno o más sitios o restos de Fc que afectan a, o que están implicados en: (1) la formación de enlace disulfuro, (2) la incompatibilidad con una célula hospedadora seleccionada, (3) la heterogeneidad de N-terminal sobre la expresión en una célula hospedadora seleccionada, (4) la glucosilación, (5) la interacción con el complemento, (6) el enlace a un receptor de Fc diferente de un receptor de salvamento, o (7) la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC). Las variantes de Fc se describen con mayor detalle a continuación en el presente documento.

El término "dominio Fc" abarca el Fc natural y las variantes y secuencias de Fc, tal como se definen anteriormente. Como con las variantes de Fc y las moléculas de Fc naturales, el término "dominio Fc" incluye las moléculas en una forma monomérica o multimérica, si se digieren a partir del anticuerpo entero o se producen por otros medios. En la presente invención, un dominio Fc se fusiona con un mutante de FGF21 con las secuencias de las proteínas de fusión tal como se definen en la tabla de la reivindicación 1. Estas proteínas de fusión pueden formar multímeros mediante la asociación de los dominios Fc, y ambas proteínas de fusión y sus multímeros son un aspecto de la presente invención.

El término "fragmento Fc modificado", tal como se utiliza en el presente documento, significará un fragmento Fc de un anticuerpo, el cual comprende una secuencia modificada. El fragmento Fc es una porción de un anticuerpo, el cual comprende las CH2, CH3 y parte de la región de articulación. El fragmento Fc modificado puede derivar, por ejemplo, de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. FcLALA es un fragmento Fc modificado con una mutación LALA (L234A, L235A), que desencadena ADCC con una eficiencia reducida, y se enlaza y activa débilmente el complemento humano. Hessel y col., 2007 Nature 449: 101-104. Las modificaciones adicionales al fragmento Fc se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N.º 7.217.798.

El término "polietilenglicol" o "PEG" se refiere a un compuesto de polialquilenglicol o a un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento, o la derivación con fracciones de acoplamiento o activadoras.

El término "trastornos asociados con FGF21", y los términos utilizados de forma similar en el presente documento, incluyen obesidad, diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglicemia, síndrome metabólico, infarto de miocardio agudo, hipertensión, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, enfermedad de arterias periféricas, ictus, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad renal, complicaciones diabéticas, neuropatía, gastroparesis, los trastornos asociados con mutaciones inactivadoras severas en el receptor de insulina.

La expresión "trastornos asociados con mutaciones inactivadoras severas en el receptor de insulina", y los términos utilizados de forma similar en el presente documento, describen las afecciones en los sujetos que padecen mutaciones en el receptor de insulina (o de las posibles proteínas directamente aguas abajo a partir del mismo) que provocan una severa resistencia a la insulina pero que con frecuencia (aunque no siempre) se ven sin la obesidad común en la diabetes mellitus de tipo 2. De muchas maneras, los sujetos afligidos con estas afecciones manifiestan síntomas híbridos de diabetes mellitus de tipo 1 y diabetes mellitus de tipo 2. Los sujetos afligidos por lo mismo caen en varias categorías de un aumento regular de la severidad, incluyendo: resistencia a la insulina Tipo A, resistencia a la insulina Tipo C (Síndrome de AKA HAIR-AN), Síndrome de Rabson-Mendenhall, y finalmente Síndrome de Donohue o Leprechaunismo. Estos trastornos están asociados con niveles de insulina endógenos muy altos, y con mucha frecuencia, con hiperglicemia. Los sujetos afligidos de esta manera también presentan diversas características clínicas asociadas con la "toxicidad de insulina", incluyendo hiperandrogenismo, síndrome del ovario poliquístico (PCOS), hirsutismo, y acantosis nigricans (crecimiento y pigmentación excesivos) en los pliegues de la piel.

"Diabetes mellitus de tipo 2" es una afección caracterizada por un exceso de la producción de glucosa a pesar de la disponibilidad de insulina, y los niveles de glucosa circulantes siguen siendo excesivamente altos como resultado de la eliminación inadecuada de la glucosa.

"Diabetes mellitus de tipo 1" es una afección caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre causados por la falta total de insulina. Esto se presenta cuando el sistema inmunológico del cuerpo ataca a las células beta productoras de insulina en el páncreas y las destruye. El páncreas entonces produce poca o ninguna insulina.

"Intolerancia a la glucosa" o "tolerancia deteriorada a la glucosa (IGT)" es un estado prediabético de disglucemia que se asocia con un mayor riesgo de patología cardiovascular. La condición prediabética impide que un sujeto mueva la glucosa hacia las células de una manera eficaz y la utilice como una fuente de combustible eficaz, conduciendo a niveles de glucosa elevados en sangre y a algún grado de resistencia a la insulina.

"Hiperglucemia" se define como un exceso de azúcar (glucosa) en la sangre.

"Hipoglucemia", también denominada como baja azúcar en sangre, se presenta cuando el nivel de glucosa en sangre cae demasiado bajo para proporcionar suficiente energía para las actividades corporales.

"Hiperinsulinemia" se define como un nivel más alto que el normal de insulina en la sangre.

- 5 "Resistencia a la insulina" se define como un estado en el que una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica por debajo de lo normal.

"Obesidad", en términos del sujeto humano, se puede definir como el peso corporal por encima del 20 % del peso corporal ideal para una población dada (R. H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, páginas 904-916).

- 10 "Complicaciones diabéticas" son los problemas causados por altos niveles de glucosa en sangre, con otras funciones corporales, tales como riñones, nervios (neuropatías), pies (úlceras y mala circulación de los pies), y ojos (por ejemplo, retinopatías). La diabetes también aumenta el riesgo de enfermedad del corazón y de los trastornos de los huesos y de las articulaciones. Otras complicaciones de la diabetes a largo plazo incluyen problemas de la piel, problemas digestivos, disfunción sexual, y problemas con los dientes y las encías.

- 15 "Síndrome metabólico" se puede definir como un grupo de al menos tres de los siguientes síntomas: grasa abdominal - en la mayoría de los hombres, una cintura de 101,6 centímetros (40 pulgadas) o mayor; alta azúcar en sangre - al menos 110 miligramos por decilitro (mg/dl) después del ayuno; altos triglicéridos - al menos 150 miligramos/decilitro en el torrente sanguíneo; baja HDL - menos de 40 miligramos/decilitro; y presión sanguínea de 130/85 mm de Hg o más alta.

"Pancreatitis" es la inflamación del páncreas.

- 20 "Dislipidemia" es un trastorno del metabolismo de las lipoproteínas, incluyendo la sobreproducción o la deficiencia de lipoproteínas. Las dislipidemias se pueden manifestar por una elevación de las concentraciones del colesterol total, del colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y de triglicéridos, y una disminución en la concentración del colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la sangre.

- 25 "Enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD)" es una enfermedad hepática, no asociada con el consumo de alcohol, caracterizada por cambios grasos de los hepatocitos.

"Esteatohepatitis no alcohólica (NASH)" es una enfermedad hepática, no asociada con el consumo de alcohol, caracterizada por cambios grasos de los hepatocitos, acompañados por inflamación intralobular y fibrosis.

- 30 "Hipertensión" o alta presión sanguínea, que es una elevación transitoria o sostenida de presión sanguínea arterial sistémica hasta un nivel que tiene probabilidades de inducir daño cardiovascular u otras consecuencias adversas. La hipertensión se ha definido arbitrariamente como una presión sanguínea sistólica por encima de 140 mm de Hg, o una presión sanguínea diastólica por encima de 90 mm de Hg.

"Enfermedades cardiovasculares" son las enfermedades relacionadas con el corazón o con los vasos sanguíneos.

- 35 "Infarto de miocardio agudo" se presenta cuando hay una interrupción del suministro de sangre hacia una parte del corazón. La isquemia y la falta de oxígeno resultante, si se deja sin tratamiento durante un período de tiempo suficiente, pueden provocar daño o la muerte (infarto) del tejido del músculo cardíaco (miocardio).

"Enfermedad de arterias periféricas" se presenta cuando se acumula placa en las arterias que llevan la sangre a la cabeza, a los órganos, y a las extremidades. A través del tiempo, la placa se puede endurecer y puede estrechar las arterias, lo cual limita el flujo de sangre rica en oxígeno hacia los órganos y hacia otras partes del cuerpo.

- 40 "Aterosclerosis" es una enfermedad vascular caracterizada por depósitos de lípidos distribuidos de forma irregular en la íntima de las arterias de tamaño grande y mediano, que provocan el estrechamiento de los lúmenes arteriales, y que proceden eventualmente fibrosis y calcificación. Las lesiones son normalmente focales y progresan lentamente y de manera intermitente. La limitación del flujo sanguíneo cuenta por la mayoría de las manifestaciones clínicas, que varían con la distribución y la gravedad de las lesiones.

- 45 "Ictus" es cualquier suceso clínico agudo, relacionado con el deterioro de la circulación cerebral, que dura más de 24 horas. Un ictus implica un daño cerebral irreversible, dependiendo el tipo y la gravedad de los síntomas de la localización y extensión de tejido cerebral cuya circulación se haya comprometido.

“Insuficiencia cardíaca”, también denominada como insuficiencia cardíaca congestiva, es una afección en la que el corazón ya no puede bombear suficiente sangre hacia el resto del cuerpo.

“Enfermedad cardíaca coronaria”, también denominada como enfermedad de arterias coronarias, es un estrechamiento de los vasos sanguíneos pequeños que suministran sangre y oxígeno al corazón.

5 “Enfermedad renal” o nefropatía es cualquier enfermedad del riñón. La nefropatía diabética es una causa importante de patología y mortalidad en las personas con diabetes mellitus de tipo 1 o de tipo 2.

“Neuropatías” son cualesquiera enfermedades que impliquen a los nervios craneales o al sistema nervioso periférico o autónomo.

10 “Gastroparesis” es la debilidad de la peristalsis gástrica, lo cual da como resultado un vaciado retardado de los intestinos.

Los pacientes críticamente enfermos abarcados por la presente invención en términos generales experimentan un estado hipermetabólico inestable. Este estado metabólico inestable se debe a los cambios en el metabolismo del sustrato, los cuales pueden llevar a deficiencias relativas en algunos nutrientes. En términos generales, hay un aumento de oxidación tanto de grasa como de músculo.

15 Más aún, los pacientes críticamente enfermos son preferentemente los pacientes que experimentan el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o la insuficiencia respiratoria. Una reducción en la patología significa reducir la probabilidad de que un paciente críticamente enfermo desarrolle enfermedades, afecciones o síntomas adicionales, o reducir la gravedad de enfermedades, afecciones o síntomas adicionales. Por ejemplo, la reducción de la patología puede corresponder a una disminución en la incidencia de bacteremia o sepsis, o de las complicaciones asociadas
20 con la falla de múltiples órganos.

Tal como se utilizan en el presente documento, las formas en singular “uno”, “una” y “el”, “la”, incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a $\pm 20\%$, más preferentemente, $\pm 10\%$, o aún más preferentemente, $\pm 5\%$ de un valor.

25 Los términos “polipéptido” y “proteína”, se utilizan indistintamente, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, los cuales pueden incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos que se presentan naturalmente y que no se dan en la naturaleza, aminoácidos químicamente o bioquímicamente modificados o derivados, y polipéptidos con estructuras base peptídicas modificadas. El término incluye las proteínas de fusión, que incluyen, pero sin limitación, las proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga,
30 las fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina en N-terminal; las proteínas marcadas de forma inmunológica; y similares.

Los términos “individuo”, “sujeto”, “hospedador” y “paciente” se utilizan indistintamente, y se refieren a cualquier sujeto para el que se desee un diagnóstico, tratamiento, o terapia, en particular seres humanos. Otros sujetos pueden incluir vacas, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, y similares. En algunas realizaciones
35 preferidas, el sujeto es un ser humano.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “muestra” se refiere al material biológico de un paciente. La muestra estudiada mediante la presente invención no se limita a algún tipo particular. Las muestras incluyen, como ejemplos no limitantes, las células individuales, las células múltiples, tejidos, tumores, fluidos biológicos, moléculas biológicas, o sobrenadantes, o extractos de cualquiera de los anteriores. Los ejemplos incluyen tejido extraído para
40 biopsia, tejido extraído durante la resección, sangre, orina, tejido linfático, fluido linfático, líquido cefalorraquídeo, moco, y muestras de heces. La muestra utilizada variará basándose en el formato de ensayo, el procedimiento de detección y la naturaleza de los tumores, tejidos, células o extractos que se vayan a estudiar. Los procedimientos para la preparación de muestras son bien conocidos en la materia, y se pueden adaptar fácilmente con el fin de obtener una muestra que sea compatible con el procedimiento empleado.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “molécula biológica” incluye, pero sin limitación, polipéptidos, ácidos nucleicos, y sacáridos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “modulación” se refiere a un cambio en la calidad o cantidad de un gen, proteína, o cualquier molécula que esté dentro, fuera, o sobre la superficie de una célula. El cambio puede ser un aumento o una disminución en la expresión o en el nivel de la molécula. El término “modular”
50 también incluye cambiar la calidad o cantidad de una función/actividad biológica, incluyendo, sin limitación, la capacidad para reducir los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos, o colesterol en sangre; para reducir los niveles de lípidos hepáticos o de triglicéridos hepáticos; para reducir el peso corporal; y para mejorar la tolerancia a la

glucosa, el gasto de energía, o la sensibilidad a la insulina.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “modulador” se refiere a una composición que modula uno o más eventos fisiológicos o bioquímicos asociados con un trastorno asociado con el FGF21, tal como diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2 o una condición metabólica como obesidad. Estos eventos incluyen, pero no se limitan a, la capacidad para reducir los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos, o colesterol en sangre; para reducir los niveles de lípidos hepáticos o de triglicéridos hepáticos; para reducir el peso corporal; y para mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto de energía, o la sensibilidad a la insulina.

Un “producto genético” es un producto biopolimérico que se expresa o se produce por un gen. Un producto genético puede ser, por ejemplo, un ARN no empalmado, un ARNm, un ARNm de una variante de empalme, un polipéptido, un polipéptido con modificación postraducciona, un polipéptido de una variante de empalme, etc. Este término también abarca los productos biopoliméricos que se hacen utilizando un producto genético de ARN como un molde (es decir, ADNc del ARN). Un producto genético se puede hacer de una manera enzimática, recombinante, química, o dentro de una célula para la que sea natural el gen. En algunas realizaciones, si el producto genético es proteínico, presenta una actividad biológica. En algunas realizaciones, si el producto genético es un ácido nucleico, se puede traducir en un producto genético proteínico que presente una actividad biológica.

“La modulación de la actividad del FGF21”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un aumento o a una disminución en la actividad del FGF21 que puede ser un resultado de, por ejemplo, la interacción de un agente con un polinucleótido o polipéptido del FGF21, la inhibición de la transcripción y/o traducción del FGF21 (por ejemplo, a través de la interacción anti-sentido o del ARNsi con el gen del FGF21 o la transcripción del FGF21, a través de la modulación de los factores de transcripción que faciliten la expresión del FGF21), y similares. Por ejemplo, la modulación de una actividad biológica se refiere a un aumento o a una disminución en una actividad biológica. La actividad del FGF21 se puede evaluar por medios que incluyen, sin limitación, ensayar los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos o colesterol en sangre en un sujeto, evaluar los niveles del polipéptido del FGF21, o mediante la evaluación de los niveles de transcripción del FGF21. También se pueden llevar a cabo comparaciones de la actividad del FGF21 mediante, por ejemplo, la medición de los niveles de un biomarcador de FGF21 aguas abajo, y la medición de los aumentos en la señalización del FGF21. La actividad del FGF21 también se puede evaluar mediante la medición de: la señalización celular; la actividad de cinasa; la absorción de glucosa en los adipocitos; las fluctuaciones del nivel de insulina, triglicéridos o colesterol en sangre; los cambios en el nivel de lípidos hepáticos o de triglicéridos hepáticos; las interacciones entre el FGF21 y un receptor del FGF21; o la fosforilación de un receptor del FGF21. En algunas realizaciones, la fosforilación de un receptor del FGF21 puede ser la fosforilación de tirosina. En algunas realizaciones, la modulación de la actividad del FGF21 puede provocar la modulación de un fenotipo relacionado con el FGF21.

También se pueden llevar a cabo comparaciones de la actividad del FGF21 mediante, por ejemplo, la medición de los niveles de un biomarcador de FGF21 aguas abajo, y la medición de los aumentos en la señalización del FGF21. La actividad del FGF21 también se puede evaluar mediante la medición de: la señalización celular; la actividad de cinasa; la absorción de glucosa en los adipocitos; las fluctuaciones del nivel de insulina, los triglicéridos o colesterol en sangre; los cambios en el nivel de lípidos hepáticos o de triglicéridos hepáticos; las interacciones entre el FGF21 y un receptor (FGFR-1c, FGFR-2c, o FGFR-3c); o la fosforilación de un receptor del FGF21. En algunas realizaciones, la fosforilación de un receptor del FGF21 puede ser la fosforilación de tirosina. En algunas realizaciones, la modulación de la actividad del FGF21 puede provocar la modulación de un fenotipo relacionado con el FGF21.

Un “biomarcador de FGF21 aguas abajo”, tal como se utiliza en el presente documento, es un gen o un producto genético, o un indicio medible de un gen o de un producto génico. En algunas realizaciones, un gen o actividad que es un marcador aguas abajo del FGF21 presenta un nivel de expresión alterado, o en un tejido vascular. En algunas realizaciones, una actividad del marcador aguas abajo se altera en presencia de un modulador del FGF21. En algunas realizaciones, los marcadores aguas abajo presentan niveles de expresión alterados cuando se altera el FGF21 con un modulador del FGF21 de la presente invención. Los marcadores de FGF21 aguas abajo incluyen, sin limitación, la absorción de glucosa o de 2-desoxiglucosa, y niveles de pERK y otras proteínas fosforiladas o acetiladas, o de NAD.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “regulación positiva” se refiere a un aumento, activación o estimulación de una actividad o cantidad. Por ejemplo, en el ámbito de la presente invención, los moduladores del FGF21 pueden aumentar la actividad de un receptor del FGF21. En una realización, uno o más de FGFR-1c, FGFR-2c, o FGFR-3c se pueden regular positivamente en respuesta a un modulador del FGF21. La regulación positiva también se puede referir a una actividad relacionada con el FGF21, tal como, por ejemplo, la capacidad para reducir los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos, o colesterol en sangre; para reducir los niveles de lípidos o de triglicéridos hepáticos; para reducir el peso corporal; para mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto de energía, o la sensibilidad a la insulina; o para provocar la fosforilación de un receptor del FGF21; o para aumentar un marcador del FGF21 corriente abajo. El receptor del FGF21 puede ser uno o más de FGFR-1c, FGFR-2c, o FGFR-3c. La regulación positiva puede ser de al menos el 25 %, de al menos el 50 %, de al menos el 75 %, de al menos el 100

%, de al menos el 150 %, de al menos el 200 %, de al menos el 250 %, de al menos el 400 %, o de al menos el 500 %, en comparación con un control.

Tal como se usa en el presente documento, el término "extremo N-terminal" se refiere a al menos los primeros 10 aminoácidos de una proteína.

5 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "dominio de N-terminal" y "región de N-terminal" se utilizan indistintamente, y se refieren a un fragmento de una proteína que empieza en el primer aminoácido de la proteína y termina en cualquier aminoácido en la mitad de N-terminal de la proteína. Por ejemplo, el dominio N-terminal del FGF21 es desde el aminoácido 1 de la SEQ ID NO: 1 hasta cualquier aminoácido entre alrededor de los aminoácidos 10 y 105 de la SEQ ID NO: 1.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "extremo C-terminal" se refiere a al menos los últimos 10 aminoácidos de una proteína.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "dominio de C-terminal" y "región de C-terminal" se utilizan indistintamente, y se refieren a un fragmento de una proteína que empieza en cualquier aminoácido en la mitad de C-terminal de la proteína y termina en el último aminoácido de la proteína. Por ejemplo, el dominio C-terminal del FGF21 empieza en cualquier aminoácido desde el aminoácido 105 hasta aproximadamente el aminoácido 200 de la SEQ ID NO: 1 y termina en el aminoácido 209 de la SEQ ID NO: 1.

20 El término "dominio", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una parte estructural de una biomolécula que contribuye a una función conocida o sospechada de la biomolécula. Los dominios pueden ser coextensivos con regiones o porciones de los mismos, y también pueden incorporar una porción de una biomolécula que es distinta de una región particular, en adición a toda o parte de esa región.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio de señal" (también denominado "secuencia señal" o "péptido señal") se refiere a un dominio peptídico que reside en un estiramiento continuo de la secuencia de aminoácidos en la región N-terminal de una proteína precursora (con frecuencia una proteína enlazada a membrana o secretada), y está implicada en el transporte postraducciona de las proteínas. En muchos casos, el dominio señal se retira de la proteína de longitud completa mediante las peptidasas señal especializadas después de que se ha llevado a cabo el proceso de selección. Cada dominio señal especifica un destino particular en la célula para la proteína precursora. El dominio señal del FGF21 está en los aminoácidos 1 a 28 de la SEQ ID NO: 1.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio de enlace al receptor" se refiere a cualquier porción o región de una proteína que está en contacto con una proteína receptora enlazada a la membrana, dando como resultado una respuesta celular, tal como un evento de señalización.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio de enlace de ligando" se refiere a cualquier porción o región de una proteína que conserva al menos una actividad cualitativa de enlace de una secuencia natural correspondiente del FGF21.

35 El término "región" se refiere a una porción físicamente contigua de la estructura primaria de una biomolécula. En el caso de las proteínas, una región se define por una porción contigua de la secuencia de aminoácidos de esa proteína. En algunas realizaciones, una "región" se asocia con una función de la biomolécula.

40 El término "fragmento", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una porción físicamente contigua de la estructura primaria de una biomolécula. En el caso de las proteínas, una porción se define por una porción contigua de la secuencia de aminoácidos de esa proteína y se refiere a al menos 3 a 5 aminoácidos, a al menos 8 a 10 aminoácidos, a al menos 11 a 15 aminoácidos, a al menos 17 a 24 aminoácidos, a al menos 25 a 30 aminoácidos, y a al menos 30 a 45 aminoácidos. En el caso de los oligonucleótidos, una porción se define por una porción contigua de la secuencia de ácido nucleico de ese oligonucleótido, y se refiere a al menos 9 a 15 nucleótidos, a al menos 18 a 30 nucleótidos, a al menos 33 a 45 nucleótidos, a al menos 48 a 72 nucleótidos, a al menos 75 a 90 nucleótidos, y a al menos 90 a 130 nucleótidos. En algunas realizaciones, las partes de las biomoléculas tienen una actividad biológica.

50 Un polipéptido de "secuencia natural" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido derivado de la naturaleza. Estos polipéptidos de secuencia natural se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. Por consiguiente, un polipéptido de secuencia natural puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido humano que se presenta de forma natural, de un polipéptido de murino, o de un polipéptido a partir de cualquier otra especie de mamífero.

Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "secuencia de nucleótidos homóloga", o "secuencia de aminoácidos homóloga", o las variaciones de las mismas, se refiere a las secuencias caracterizadas por una

- homología, al nivel de los nucleótidos o al nivel de los aminoácidos, de al menos un porcentaje especificado, y se utiliza de manera intercambiable con "identidad de secuencia". Las secuencias de nucleótidos homólogas incluyen las secuencias que codifican las isoformas de proteínas. Estas isoformas se pueden expresar en diferentes tejidos del mismo organismo como resultado de, por ejemplo, el empalme alternado del ARN. Como alternativa, las isoformas pueden estar codificadas por diferentes genes. Las secuencias de nucleótidos homólogas incluyen las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de una especie diferente de la humana, incluyendo, pero sin limitación, mamíferos. Las secuencias de nucleótidos homólogas también incluyen, pero sin limitación, las variaciones alélicas y mutaciones de origen natural de las secuencias de nucleótidos establecidas en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos homólogas incluyen las secuencias de aminoácidos que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas y cuyos polipéptidos tienen el mismo enlace y/o actividad. El porcentaje de homología o de identidad se puede determinar mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8, para UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI), utilizando los valores predeterminados, el cual utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).
- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término "mezclar" se refiere al proceso de combinar uno o más compuestos, células, moléculas, y similares entre sí en la misma área. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, en un tubo de ensayo, en una placa de Petri, o en cualquier recipiente que permita que se mezclen el uno o más compuestos, células, o moléculas.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente purificado" se refiere a un compuesto (por ejemplo, cualquiera de un polinucleótido o un polipéptido o un anticuerpo) que se remueve de su medio ambiente natural, y es al menos el 60 % libre, al menos el 75 % libre, y al menos el 90 % libre de otros componentes con los que se asocia de forma natural.
- 15 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tal como los anticuerpos o un polipéptido, genes, y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que reciba la composición, y el cual se pueda administrar sin una toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser grandes macromoléculas que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, poliácidos lácticos, poliácidos glicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos y partículas de virus inactivos. Estos vehículos son bien conocidos por los expertos en la materia. Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden incluir líquidos, tales como agua, suero, glicerol y etanol. En estos vehículos también puede haber sustancias auxiliares presentes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias reguladoras del pH, y similares.
- 20
- 25
- 30

Mejoras en la estabilidad física de las proteínas de fusión de la invención

- Los enlaces disulfuro de origen natural, tales como los proporcionados por los restos de cisteína, en términos generales aumentan la estabilidad termodinámica de las proteínas. Los ejemplos de éxito del aumento de la estabilidad termodinámica, tal como se mide en el aumento de la temperatura de fusión, son múltiples mutantes enlazados con disulfuro de las enzimas de lisozima T4 (Matsumura y col., PNAS 86: 6562-6566 (1989)), y barnasa (Johnson y col., J. Mol. Biol. 268: 198-208 (1997)). Un aspecto de la presente invención es una mejora de la estabilidad física del FGF21 en presencia de un conservante, lograda mediante la presencia de enlaces de disulfuro dentro de las variantes, que limitan la flexibilidad del FGF21 de tipo silvestre, y de esta manera limitan el acceso del conservante al núcleo hidrofóbico de la proteína.
- 35
- 40
- El segundo aspecto de la presente invención, por consiguiente, proporciona variantes de FGF21 humano, o un péptido biológicamente activo del mismo, engendrándose una mejor estabilidad farmacéutica mediante la incorporación de enlaces de disulfuro adicionales, por ejemplo, mediante la incorporación o sustitución de los restos de cisteína en la proteína de FGF21 de tipo silvestre. Un experto en la materia reconocerá que se podrían utilizar las cisteínas naturales, cisteína 103 y cisteína 121, como *loci* para introducir un nuevo enlace disulfuro que pueda impartir propiedades mejoradas, además de las realizaciones descritas en el presente documento.
- 45

Mejoras en las proteínas de fusión de la invención sobre los comparadores de proteínas de tipo silvestre y variantes de los mismos

- Es bien sabido en la materia que un desafío significativo en el desarrollo de productos farmacéuticos de proteínas es lidiar con las inestabilidades físicas y químicas de las proteínas. Esto es incluso más evidente cuando se pretende que una formulación farmacéutica de proteína sea una formulación inyectable para usos múltiples que requiera de una solución concentrada y conservada estable, mientras que se mantenga un perfil de bioactividad favorable. La caracterización biofísica del FGF21 de tipo silvestre en la bibliografía, establece que una solución concentrada de proteína (>5 miligramos/mililitro), cuando se expone a condiciones de tensión, tales como alta temperatura o bajo pH, lleva a una asociación y acumulación aceleradas (es decir, malas propiedades de estabilidad física y
- 50
- 55

biofarmacéuticas). La exposición de una solución concentrada de proteína de FGF21 a conservantes farmacéuticos (por ejemplo, m-cresol) también tuvo un impacto negativo sobre la estabilidad física.

Por lo tanto, una realización de la presente invención es mejorar la estabilidad física de las soluciones concentradas, mientras que se mantiene la estabilidad química y la potencia biológica, en condiciones de formulación tanto fisiológicas como conservadas. Se piensa que la asociación y acumulación pueden ser resultado de las interacciones hidrófobas, debido a que, en una concentración dada de proteína, la temperatura y la fuerza iónica tienen un impacto considerable sobre la estabilidad física. Para la mayor parte, se dirigieron los restos de aminoácidos no conservados, presumiblemente con la superficie expuesta. Se analizó el ambiente local de estos restos, y para la mutagénesis se seleccionaron aquellos que no se consideraron estructuralmente importantes. Un procedimiento para iniciar los cambios específicos es disminuir adicionalmente el pI de la proteína mediante la introducción de restos de ácido glutámico ("exploración de ácido glutámico"). Se hipotetiza que la introducción de sustitutos cargados inhibiría la acumulación hidrofóbicamente mediada por medio de la repulsión entre cargas y mejoraría potencialmente la compatibilidad del conservante. Además, una persona experta en la materia también reconocería que, con suficiente grado de mutagénesis, el pI se podría cambiar hasta un intervalo de pH básico mediante la introducción de una carga positiva con o sin una disminución concomitante en la carga negativa, permitiendo, por lo tanto, la repulsión entre cargas.

Una dificultad adicional asociada a las aplicaciones terapéuticas del FGF21 de tipo silvestre como un producto bioterapéutico, por ejemplo, es que su vida media es muy corta *in vivo* (del orden de 0,5 y 2 horas, respectivamente, en el ratón y en el primate). Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar compuestos de seguimiento que sean más eficaces, ya sea a través de una potencia más alta o bien de una vida media más larga. Las proteínas de fusión de la invención se desarrollaron como una manera de lograr los efectos deseables del tratamiento con el FGF21 en una formulación con una potencia más alta y con una vida media extendida.

Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, las proteínas de fusión de la invención tienen vidas medias de más de dos semanas en el ratón, en comparación con la vida media mucho más corta del FGF21 de tipo silvestre y la vida media de 17 horas de la proteína de fusión Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) de La Publicación Internacional del TCP N.º WO10/129600. Las proteínas de fusión de la invención también muestran una mayor vida media y mejores propiedades farmacocinéticas en comparación con el V76 PEGilado, tal como se describe en el presente documento y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 61/415,476, presentada el 19 de noviembre de 2010.

Adicionalmente, las proteínas de fusión de la variante Fc-FGF21 de la invención en 1 miligramo por kilogramo (mpk) son más eficaces que el V76 en 5 miligramos por kilogramo (mpk) para reducir la glucosa, la insulina, el peso corporal, y los lípidos en hígado. En un estudio de tratamiento de 12 días en ratones ob/ob, las proteínas de fusión muestran el siguiente porcentaje de cambios en relación con el vehículo (todas las fusiones se administran a 1,0 miligramo/ kilogramo, y el V76 se administra a 5,0 miligramos/kilogramo):

Porcentaje de cambio de glucosa total (ABC) en relación con el vehículo: V76 es -42 %; V101 es -53 %, V103 es -46 %, y V188 es -42 %;
 Porcentaje de cambio de insulina total en plasma en relación con el vehículo: V76 es -46 %; V101 es -82 %, V103 es -69 %, y V188 es -59 %;
 Porcentaje de cambio de peso corporal total en relación con el vehículo: V76 es -7 %; V101 es -12 %, V103 es -12 %, y V188 es -11 %; y Porcentaje de cambio de lípidos totales en hígado en relación con el vehículo: V76 es -30 %; V101 es -44 %, V103 es -50 %, y V188 es -51 %.

De una manera similar, los ensayos *in vitro* revelan las mismas 5 veces o más potencia de las proteínas de fusión de la invención sobre el V76:

En el pERK en el ensayo de adipocitos humanos (CE_{50} promedio $\pm$ EEM), V76 es 21 ± 2 nM ($n = 3$); V101 es $1,0 \pm 0,1$ nM ($n = 3$), V103 es $1,3 \pm 0,2$ nM ($n = 3$), y V188 es $1,4 \pm 0,4$ nM ($n = 3$);
 En el pERK en HEK293 con el ensayo de β -klotho humano (CE_{50} promedio $\pm$ EEM), V76 es 13 ± 4 nM ($n = 5$), V101 es $0,60 \pm 0,06$ nM ($n = 5$), V103 es $0,9 \pm 0,3$ nM ($n = 5$), y V188 es $0,4 \pm 0,1$ nM ($n = 3$); y
 En la absorción de glucosa en el ensayo de adipocitos de ratón (CE_{50} promedio $\pm$ EEM), V76 es 5 ± 1 nM ($n = 3$), V101 es $0,60 \pm 0,06$ nM ($n = 3$), V103 es $0,60 \pm 0,07$ nM ($n = 3$), y V188 es $0,48 \pm 0,14$ nM ($n = 3$).

Aunque las realizaciones de la presente invención se refieren a la estabilidad física y química en condiciones de una formulación farmacéutica fisiológica y conservada, el mantenimiento de la potencia biológica de las proteínas de fusión de la invención en comparación, por ejemplo, con el FGF21 de tipo silvestre, es también un factor de consideración importante. Por consiguiente, la potencia biológica de las proteínas de la presente invención se define mediante la capacidad de las proteínas para afectar a la absorción de la glucosa y/o para disminuir los niveles de glucosa en plasma, tal como se muestra en el presente documento en los ejemplos.

Las proteínas de fusión de la invención administradas de acuerdo con la presente invención se pueden generar y/o aislar mediante cualquier medio conocido en la materia. El procedimiento más preferido para producir la variante es mediante las metodologías de ADN recombinante, y son bien conocidas por los expertos en la materia. Estos procedimientos se describen en Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.).

En la materia ya se ha establecido que los fragmentos de péptidos de ciertos factores de crecimiento de fibroblastos son biológicamente activos. Véase, por ejemplo, Baird y col., Proc. Natl. Acad. Sci (EUA) 85: 2324-2328 (1988), y J. Cell. Phys. Suppl. 5: 101-106 (1987). Por consiguiente, la selección de fragmentos o péptidos de la variante se basa en criterios conocidos en la materia. Por ejemplo, se sabe que la dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV o DPP-4) es una proteasa tipo serina implicada en la inactivación de los neuropéptidos, péptidos endocrinos, y citocinas (Damme y col., Chem. Immunol. 72: 42-56, (1999)). El extremo N-terminal del FGF21 (HisProllePro) contiene dos dipéptidos que podrían ser potencialmente sustratos para la DPP-IV, dando como resultado un fragmento del FGF21 truncado en el extremo N-terminal por 4 aminoácidos. De manera inesperada, se ha demostrado que este fragmento del FGF21 de tipo silvestre conserva su actividad biológica, y las proteínas de la presente invención truncadas en el extremo N-terminal por estos 4 aminoácidos. La invención también abarca polinucleótidos que codifican las variantes anteriormente descritas que pueden estar en la forma de ARN o en la forma de ADN, cuyo ADN incluye ADNc, ADN genómico, y ADN sintético. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena simple. Las secuencias codificantes que codifican las proteínas de la presente invención pueden variar como resultado de la redundancia o degeneración del código genético.

Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la invención pueden incluir los siguientes: la secuencia codificante para la variante, la secuencia codificante para la variante y una secuencia codificante adicional, tal como un polipéptido funcional, o una secuencia líder o secretora o una secuencia de proproteína; la secuencia codificante para la variante y una secuencia no codificante, tal como una secuencia de intrones o no codificante 5' y/o 3' de la secuencia codificante para la variante. Por lo tanto, el término "polinucleótido que codifica una variante" abarca un polinucleótido que puede incluir no solamente la secuencia codificante para la variante sino también un polinucleótido, que incluye una secuencia codificante y/o no codificante adicional.

Los polinucleótidos de la invención se expresarán en los hospedadores después de que las secuencias se hayan enlazado operativamente a (es decir, se hayan colocado para asegurar el funcionamiento de) una secuencia de control de la expresión. Estos vectores de expresión típicamente se pueden replicar en los organismos hospedadores ya sea como episomas o bien como una parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Normalmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina, y reductasa de dihidrofolato, para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas. La variante de FGF21 se puede expresar en células de mamífero, de insectos, levadura, bacterianas u otras células bajo el control de los promotores apropiados. También se pueden emplear sistemas de traducción sin células para producir estas proteínas utilizando ARN derivados a partir de las construcciones de ADN de la presente invención.

E. coli es un hospedador procariota útil en particular para la clonación de los polinucleótidos de la presente invención. Otros hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diversas especies de *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, y *Staphylococcus*, aunque también se pueden emplear otras como un asunto de elección. En estos hospedadores procariotas, también se pueden crear vectores de expresión, los cuales típicamente contendrán secuencias de control de expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, puede haber cualquiera de un número de promotores bien conocidos presente, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (Trp), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor a partir de fagos lambda o T7. Los promotores típicamente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitio de unión de ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Salvo que se observe de otra manera, las proteínas de la presente invención expresadas en *E. coli* tienen una secuencia de metionina introducida en el extremo N-terminal.

También se pueden utilizar otros microbios, tales como levaduras u hongos, para la expresión. Los ejemplos de los hospedadores de levadura preferidos son *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia angusta*, teniendo los vectores adecuados secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfo-glicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, como se desee. *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, y *Schizophyllum commune*, son los ejemplos de los hospedadores fúngicos, aunque también se pueden emplear otros como un asunto de elección.

También se puede utilizar un cultivo de tejido-células de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención. En realidad se prefieren las células eucarióticas, debido a que se han desarrollado en la materia un número de líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar las variantes intactas, e incluyen las líneas celulares de CHO, diversas líneas celulares de COS, células de NSO, las líneas celulares de ovario de hámster sirio (SHO), células HeLa, o líneas celulares de riñón embrionario humano (es decir, HEK293,

HEK293EBNA).

5 Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador, y los sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de transcripción. Las secuencias de control de la expresión preferidas son los promotores que derivan de SV40, adenovirus, virus de papiloma bovino, citomegalovirus, virus de sarcoma de Rous, y similares. Los sitios de poliadenilación preferidos incluyen las secuencias que derivan de SV40 y la hormona de crecimiento bovina.

10 Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las proteínas de fusión de la invención, y las secuencias de control de expresión) se pueden transferir a la célula hospedadora mediante los procedimientos bien conocidos, los cuales varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, comúnmente se utiliza la transfección con cloruro de calcio para las células procarióticas, mientras que se puede utilizar el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para otros hospedadores celulares.

15 Se pueden emplear diversos procedimientos de purificación de proteína y estos procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990), y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982). Las etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción empleado para las proteínas de fusión de la invención.

20 Las proteínas de la invención, por ejemplo, las proteínas de fusión de actividad doble de la invención, se deben formular y dosificar en una forma consistente con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición clínica del paciente, el sitio de suministro de las composiciones de proteína, el procedimiento de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" de las proteínas de fusión de la invención, para los propósitos del presente documento, por consiguiente, se determina mediante tales consideraciones.

25 Las composiciones farmacéuticas de las proteínas de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier medio que logre el propósito generalmente pretendido: para tratar diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2, obesidad, síndrome metabólico, o a los pacientes críticamente enfermos. Los medios permisibles no limitantes de administración incluyen, por ejemplo, mediante inhalación o supositorio o al tejido mucoso, tal como mediante lavado al tejido vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual, por vía oral, nasal, tópica, intranasal, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intramuscular, intraesternal, mediante inyección intraarticular, intralinfática, intersticial, intraarterial, subcutánea, intrasínovial, transepitelial, y transdérmica. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran mediante lavado, por vía oral o interarterial. Otros procedimientos adecuados de introducción también pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables, y dispositivos poliméricos de liberación lenta o sostenida. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden administrar como parte de una terapia de combinación con otros agentes metabólicos conocidos.

35 La dosificación administrada dependerá de la edad, de la salud, y del peso del receptor, de la clase de tratamiento concurrente, en su caso, de la frecuencia del tratamiento, y de la naturaleza del efecto deseado. Las composiciones dentro del ámbito de la invención incluyen todas las composiciones en donde esté presente una variante de FGF21 en una cantidad que sea eficaz para lograr el efecto médico deseado para el tratamiento de diabetes mellitus de tipo 1 o de tipo 2, de obesidad, o de síndrome metabólico. Aunque las necesidades individuales pueden variar de un paciente a otro, la determinación de los intervalos óptimos de las cantidades eficaces de todos los componentes está dentro de la capacidad del médico experto en la materia.

45 Las proteínas de la presente invención se pueden formular de acuerdo con los procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Una formulación deseada sería una que sea un producto liofilizado estable que se reconstituya con un diluyente apropiado o con una solución acuosa de alta pureza con vehículos, conservantes, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales [Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16ª Edición (1980)]. Las proteínas de la presente invención se pueden combinar con un tampón farmacéuticamente aceptable, y el pH se ajusta para proporcionar una estabilidad aceptable, y un pH aceptable para la administración.

50 Para su administración parenteral, en una realización, las proteínas de fusión de la invención se formulan en términos generales mediante la mezcla de una o más de ellas en el grado de pureza deseado, en una forma de dosificación unitaria inyectable (solución, suspensión, o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que no sea tóxico para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, y que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación. Preferentemente, se pueden agregar uno o más agentes antimicrobianos farmacéuticamente aceptables. Los agentes antimicrobianos farmacéuticamente aceptables preferidos son fenol, m-cresol, y alcohol bencílico.

Opcionalmente, se pueden agregar una o más sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la concentración iónica o la tonicidad. Se pueden agregar uno o más excipientes para ajustar adicionalmente la isotonicidad de la formulación. Los ejemplos de un excipiente de ajuste de isotonicidad son glicerina, cloruro de sodio, y manitol.

- Los expertos en la materia pueden optimizar fácilmente las dosificaciones farmacéuticamente eficaces y los regímenes de administración para las composiciones terapéuticas que comprendan las proteínas de la invención, tal como se determine mediante la buena práctica médica y la condición clínica del paciente en particular. Un intervalo de dosis típico para las proteínas de la presente invención estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 miligramos al día a aproximadamente 1.000 miligramos al día (o de aproximadamente 0,05 miligramos por semana a aproximadamente 5.000 miligramos por semana, administrados una vez por semana) para un adulto.
- Preferentemente, la dosificación está en el intervalo de aproximadamente 0,1 miligramos al día a aproximadamente 100 miligramos al día (o de aproximadamente 0,5 miligramos por semana a aproximadamente 500 miligramos por semana, administrados una vez por semana), más preferentemente de aproximadamente 1,0 miligramo al día a aproximadamente 10 miligramos al día (o de aproximadamente 5 miligramos por semana a aproximadamente 50 miligramos por semana, administrados una vez por semana). Muy preferentemente, la dosificación es de aproximadamente 1 a 5 miligramos al día (o de aproximadamente 5 miligramos por semana a aproximadamente 25 miligramos por semana, administrados una vez por semana). La dosis apropiada de una variante de FGF21 administrada dará como resultado la reducción de los niveles de glucosa en sangre y el aumento del gasto de energía mediante una utilización más rápida y más eficaz de la glucosa y, por consiguiente, es útil para el tratamiento de diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2, de obesidad, y de síndrome metabólico.
- Además, debido a que la hiperglucemia y la resistencia a la insulina son comunes en los pacientes críticamente enfermos que reciban apoyo nutricional, algunas unidades de cuidados intensivos (UCI) administran insulina para tratar la hiperglucemia excesiva en los pacientes críticamente enfermos que reciben asistencia. De hecho, los estudios recientes documentan que el uso de insulina exógena para mantener la glucosa en sangre en un nivel no más alto que 110 miligramos por decilitro, redujo la patología y la mortalidad entre los pacientes críticamente enfermos en la unidad quirúrgica de cuidados intensivos, independientemente de si tenían o no antecedentes de diabetes (Van den Berghe y col., N Engl J Med., 345(19): 1359, (2001)). Por consiguiente, las proteínas de la presente invención son adecuadas de una manera única para ayudar a restaurar la estabilidad metabólica en los pacientes críticamente enfermos metabólicamente inestables. Las proteínas de la invención que contienen variantes de FGF21, son únicas porque estimulan la absorción de la glucosa y potencian la sensibilidad a la insulina pero no inducen hipoglucemia.

- En otro aspecto de la presente invención, se contemplan las proteínas de la invención para su uso como un medicamento para el tratamiento de obesidad, diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, infarto de miocardio agudo, afecciones asociadas con mutaciones inactivadoras severas en el receptor de insulina.

Mutantes de FGF21 específicos del sitio

Otras realizaciones de la invención incluyen, pero sin limitación, las siguientes uniones, para la extensión de la vida media: lípido de enlace a HSA o molécula pequeña o micelio, a la versión monomérica o a una versión dimérica de la fusión.

- En ciertas realizaciones de la invención, se pueden hacer otras uniones a las proteínas de la invención, para lograr la extensión de la vida media y otras propiedades biológicas mejoradas. Pueden incluir la unión de los conjugados de PEG-colesterol (incluyendo micelios y liposomas) a las proteínas de la invención, y/o la unión de los azúcares (glucosilación) a las proteínas de la invención. En otras realizaciones más, se emplean técnicas similares para añadir conjugados de, por ejemplo, poliácido siálico (PSA), almidón de hidroxietilo (HES), ligandos de enlace de albúmina, o protecciones de carbohidratos, a las proteínas.

- La técnica de HESilación, por ejemplo, acopla las cadenas de almidón de hidroxietilo (HES) ramificadas (de 60 kDa o 100 kDa, fragmentos de amilopectina altamente ramificado a partir de almidón de maíz) con una proteína, polipéptido y/o péptido, mediante alquilación reductiva. La polisilación conjuga las proteínas, los polipéptidos, y/o los péptidos de interés con los polímeros de poliácido siálico (PSA) de una manera similar a la PEGilación. Los polímeros de poliácido siálico (PSA) son polímeros no inmunogénicos negativamente cargados de origen natural en el cuerpo y están disponibles en los pesos moleculares de 10 a 50 kD.

- En otras realizaciones más de la invención, se pueden hacer otras uniones o modificaciones a las proteínas de la invención, para lograr la extensión de la vida media y otras propiedades biológicas mejoradas. Éstas incluyen la creación de grupos PEG recombinantes (rPEG), y su unión a las proteínas de la invención. Tal como se desarrolla por la compañía Amunix, Inc., la tecnología de rPEG se basa en secuencias de proteínas con propiedades de tipo PEG que se fusionan genéticamente con productos biofarmacéuticos, eliminando la etapa adicional de la

conjugación química. Los rPEG son construcciones de exenatida de una vida media extendida que contienen una cola no estructurada larga de aminoácidos hidrofílicos, y que son capaces tanto de aumentar la vida media en suero de una proteína o de un péptido, como de hacer más lenta su velocidad de absorción, reduciendo significativamente de esta manera la proporción de cresta-valle. Los rPEG tienen un radio hidrodinámico aumentado, y muestran un peso molecular aparente que es aproximadamente 15 veces su peso molecular real, imitando la manera en que la PEGilación logra una larga vida media en el suero.

Polipéptidos de FGF21 truncados

La presente invención se refiere a las formas truncadas del polipéptido de FGF21 maduro (SEQ ID NO: 3), en donde las secuencias son tal como se dan en la tabla de la reivindicación 1. Esto surgió a partir de un esfuerzo por identificar los polipéptidos de FGF21 truncados que fueran capaces de proporcionar una actividad que fuera similar y, en algunos casos, superior a las formas no truncadas del polipéptido de FGF21 maduro.

Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptido de FGF21 truncado" se refiere a un polipéptido de FGF21 en donde se han removido restos de aminoácidos a partir del extremo amino-terminal (o N-terminal) del polipéptido de FGF21, se han removido restos de aminoácidos a partir del extremo carboxilo-terminal (o C-terminal) del polipéptido de FGF21, o se han removido restos de aminoácidos a partir de tanto el extremo amino-terminal como del carboxilo-terminal del polipéptido de FGF21. Los diversos truncamientos que se dan a conocer en el presente documento se prepararon tal como se describe en el presente documento.

La actividad de los polipéptidos de FGF21 truncados en N-terminal y de los polipéptidos de FGF21 truncados en C-terminal se puede ensayar utilizando un ensayo de fosfo-ERK *in vitro*. Los detalles específicos de los ensayos *in vitro* que se pueden utilizar para examinar la actividad de los polipéptidos de FGF21 truncados se pueden encontrar en los ejemplos.

La actividad de los polipéptidos de FGF21 truncados de la presente invención también se puede evaluar en un ensayo *in vivo*, tal como en ratones ob/ob. En términos generales, para evaluar la actividad *in vivo* de un polipéptido de FGF21 truncado, el polipéptido de FGF21 truncado se puede administrar a un animal de prueba por vía intraperitoneal. Después de un período de incubación deseado (por ejemplo, un hora o más), se puede extraer una muestra de sangre, y se pueden medir los niveles de glucosa en sangre.

a. Truncamientos en N-terminal

Los polipéptidos de FGF21 truncados que tienen truncamientos en N-terminal de menos de 9 restos de aminoácidos conservan la capacidad del polipéptido de FGF21 maduro para reducir la glucosa en sangre en un individuo. La presente invención abarca proteínas de fusión que comprenden las formas truncadas en N-terminal del polipéptido de FGF21 maduro con las secuencias tal como se dan en la tabla 1 de la reivindicación 1.

b. Truncamientos en C-terminal

Los polipéptidos de FGF21 truncados que tienen truncamientos en C-terminal de menos de 13 restos de aminoácidos mostraron una eficacia de al menos el 50 % de la eficacia del FGF21 de tipo silvestre en un ensayo de ELK-luciferasa *in vitro* (Yie J. y col., FEBS Letts 583: 19-24 (2009)), lo que indica que estos mutantes de FGF21 conservan la capacidad del polipéptido de FGF21 maduro para reducir la glucosa en sangre en un individuo.

c. Truncamientos en N-terminal y en C-terminal

Desvelados en el presente documento con fines ilustrativos, los polipéptidos de FGF21 truncados pueden tener una combinación de truncamientos en N-terminal y en C-terminal. Los polipéptidos de FGF21 truncados que tienen una combinación de truncamientos en N-terminal y en C-terminal comparten la actividad de los polipéptidos de FGF21 truncados correspondientes que tengan cualquiera de los truncamientos solo en N-terminal o en C-terminal. En otras palabras, los polipéptidos de FGF21 truncados que tienen tanto los truncamientos en N-terminal de menos de 9 restos de aminoácidos como los truncamientos en C-terminal de menos de 13 restos de aminoácidos, poseen una actividad reductora de la glucosa en sangre similar o mayor a la de los polipéptidos de FGF21 truncados que tienen truncamientos en N-terminal de menos de 9 restos de aminoácidos o de los polipéptidos de FGF21 truncados que tienen truncamientos en C-terminal de menos de 13 restos de aminoácidos.

Los polipéptidos de FGF21 truncados de la presente invención se pueden preparar tal como se describe en los Ejemplos descritos en el presente documento. Los expertos en la materia, familiarizados con las técnicas habituales de biología molecular, pueden emplear ese conocimiento, junto con la presente divulgación, para hacer y usar los polipéptidos de FGF21 truncados de la presente invención. Se pueden emplear las técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejido, y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, citado anteriormente.

Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden llevar a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, tal como se llevan a cabo comúnmente en la materia, o tal como se describen en el presente documento. A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritos en el presente documento, son bien conocidos y comúnmente empleados en la materia. Se pueden emplear las técnicas convencionales para las síntesis químicas; los análisis químicos; la preparación, formulación y suministro farmacéutico; y el tratamiento de los pacientes.

Los polipéptidos de la variante truncada de FGF21 de la presente invención se fusionan con la región Fc, tal como se define en las secuencias de la tabla de la reivindicación 1. Esta fusión se puede llevar a cabo empleando los procedimientos biológicos moleculares conocidos y/o las directrices proporcionadas en el presente documento. Los beneficios de estos polipéptidos de fusión, así como los procedimientos para la elaboración de estos polipéptidos de fusión, se describen con mayor detalle en el presente documento.

Proteínas de Fusión de FGF21

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido de fusión de FGF21" o "proteína de fusión de FGF21" se refiere a una fusión de uno o más restos de aminoácidos (tal como una proteína o un péptido heterólogo) en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de cualquier variante de proteína de FGF21 descrita en el presente documento.

Las proteínas de fusión de FGF21 de acuerdo con la invención se hacen mediante la fusión de secuencias heterólogas en el extremo N-terminal de una variante de proteína de FGF21, tal como se define en la tabla de la reivindicación 1.

a. Fusiones de Fc

En la presente invención, una variante de la proteína de FGF21 se fusiona con un dominio de una región Fc de la IgG humana. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se enlaza a un antígeno, y un dominio constante conocido como "Fc", que está implicado en las funciones efectoras, tales como la activación del complemento y el ataque por parte de las células fagocíticas. Un Fc tiene una larga vida media en suero, mientras que un Fab es de vida corta (Capon y col., 1989, Nature 337: 525-31). Cuando se une junto con una proteína terapéutica, un dominio Fc puede proporcionar una vida media más larga, o puede incorporar funciones tales como el enlace al receptor de Fc, el enlace de proteína A, la fijación del complemento, y tal vez incluso la transferencia placentaria (Capon y colaboradores, 1989).

A través de toda la divulgación, Fc-FGF21 se refiere a una proteína de fusión en donde la secuencia de Fc se fusiona con el extremo N-terminal del FGF21. De una manera similar, a través de toda la divulgación, FGF21-Fc se refiere a una proteína de fusión en donde la secuencia de Fc se fusiona con el extremo C-terminal del FGF21.

Las proteínas de fusión de la invención son las proteínas de fusión de Fc-FGF21 que comprenden variantes de FGF21, tal como se definen en la tabla de la reivindicación 1.

La proteína de fusión de FGF21 se puede purificar, por ejemplo, mediante el uso de una columna de afinidad con proteína A. Se ha descubierto que los péptidos y proteínas fusionados con una región Fc presentan una vida media *in vivo* sustancialmente mayor que la contraparte no fusionada. También, una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc de origen natural, o se puede alterar para mejorar ciertas cualidades, tales como cualidades terapéuticas, tiempo de circulación, o aglomeración reducida.

Las modificaciones útiles de los agentes terapéuticos de proteína mediante su fusión con el dominio "Fc" de un anticuerpo se describen con detalle en la Publicación Internacional del TCP N.º WO 00/024782. Este documento describe el enlace a un "vehículo", tal como polietilenglicol (PEG), dextrano, o una región Fc.

b. Enlazadores de Proteínas de Fusión

Cuando se forman las proteínas de fusión de la presente invención, se emplea un enlazador. La estructura química del enlazador puede no ser crítica, debido a que sirve primordialmente como un separador. El enlazador se compone de aminoácidos enlazados entre sí mediante enlaces peptídicos. Los enlazadores empleados en la presente invención se dan en la tabla de la reivindicación 1.

Proteínas de fusión químicamente modificadas

Las formas químicamente modificadas de las proteínas de fusión descritas en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, las formas truncadas y variantes de las fusiones de FGF21 descritas en el presente documento, se pueden preparar por un experto en la materia, dadas las divulgaciones descritas en el presente documento. Estas proteínas de fusión químicamente modificadas se alteran de tal manera que el mutante químicamente modificado es diferente del mutante no modificado, ya sea en el tipo o bien en la localización de las moléculas unidas de forma natural al mutante. Los mutantes químicamente modificados pueden incluir moléculas formadas mediante la supresión de uno o más grupos químicos unidos de forma natural.

En una realización, las proteínas de la presente invención se pueden modificar mediante la unión covalente de uno o más polímeros. Por ejemplo, el polímero seleccionado es típicamente soluble en agua, de tal manera que la proteína con la que está unido no precipita en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. Dentro del alcance de los polímeros adecuados se incluye una mezcla de polímeros. Preferentemente, para el uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable. Los polímeros no solubles en agua conjugados con las proteínas de la presente invención también forman un aspecto de la invención.

Los polímeros de ejemplo pueden ser cada uno de cualquier peso molecular y pueden estar ramificados o no ramificados. Los polímeros tienen cada uno típicamente un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término "aproximadamente" que en las preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más y algunas menos que el peso molecular mencionado). El peso molecular promedio de cada polímero es preferentemente de entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, más preferentemente de entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa, y de manera muy preferente, de entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 35 kDa.

Los polímeros solubles en agua o mezclas de los mismos incluyen, pero sin limitación, carbohidratos N-enlazados u O-enlazados, azúcares, fosfatos, polietilenglicol (PEG) (incluyendo las formas de PEG que se han utilizado para derivar proteínas, incluyendo mono-(C1-C10), alcoxi-, o ariloxi-polietilenglicol), mono-metoxi-polietilenglicol, dextrano (tal como dextrano de bajo peso molecular de, por ejemplo, aproximadamente 6 kDa), celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos, poli-(N-vinil-pirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de polióxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxielitados (por ejemplo, glicerol), y polialcohol vinílico. También la presente invención abarca las moléculas de reticulación bifuncionales que se pueden utilizar para preparar los multímeros de la variante de proteína de FGF21 unida covalentemente. La presente invención también abarca los mutantes de FGF21 unidos de manera covalente a poliácido siálico.

Los polímeros de polisacáridos son otro tipo de polímeros solubles en agua que se pueden utilizar para la modificación de proteínas. Por lo tanto, las proteínas de fusión de la invención fusionadas con un polímero de polisacárido forman las realizaciones de la presente invención. Los dextranos son polímeros de polisacáridos comprendidos por subunidades individuales de glucosa predominantemente enlazadas mediante enlaces de alfa 1-6. El dextrano mismo está disponible en muchos intervalos de peso molecular, y está fácilmente disponible en pesos moleculares de aproximadamente 1 kD a aproximadamente 70 kD. El dextrano es un polímero soluble en agua adecuado para su uso como un vehículo por sí mismo o en combinación con otro vehículo (por ejemplo, Fc). Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO 96/11953. Se ha documentado el uso de dextrano conjugado con inmunoglobulinas terapéuticas o de diagnóstico. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Europea N.º 0 315 456. La presente invención también abarca el uso de dextrano de aproximadamente 1 kD a aproximadamente 20 kD.

En general, la modificación química se puede llevar a cabo en cualquier condición adecuada utilizada para hacer reaccionar una proteína con una molécula polimérica activada. Los procedimientos para la preparación polipéptidos químicamente modificados comprenderán en términos generales las etapas de: (a) hacer reaccionar el polipéptido con la molécula polimérica activada (tal como un derivado de éster o aldehído reactivo de la molécula polimérica), en condiciones en donde una variante de proteína de FGF21 llega a unirse a una o más moléculas poliméricas, y (b) obtener los productos de la reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán basándose en los parámetros conocidos y en el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción de las moléculas poliméricas a la proteína, mayor será el porcentaje de moléculas poliméricas unidas. En otra realización de la presente invención, las proteínas de la invención se pueden acoplar químicamente a la biotina. La biotina/las proteínas de la invención, se dejan entonces enlazarse a la avidina, dando como resultado las avidina/biotina/proteínas de la invención trivalentes. Las proteínas de la invención también se pueden acoplar covalentemente a dinitro-fenol (DNP) o a trinitro-fenol (TNP), y los conjugados resultantes se precipitan con anti-DNP o anti-TNP-IgM, para formar los conjugados decaméricos con una valencia de 10.

En términos generales, las afecciones que se pueden aliviar o modular mediante la administración de los presentes mutantes de FGF21 químicamente modificados incluyen aquellas descritas en el presente documento para las proteínas de la invención. Sin embargo, los mutantes de FGF21 químicamente modificados que se desvelan en el presente documento, pueden tener actividades adicionales, una actividad biológica mejorada o reducida, u otras

características, tales como un aumento o una disminución de su vida media, comparándose con los mutantes de FGF21 no modificados.

Composiciones terapéuticas de las proteínas de fusión y administración de las mismas

5 La presente invención también proporciona composiciones terapéuticas que comprenden una o más de las proteínas de fusión de la invención descritas en la tabla de la reivindicación 1 y en mezcla con un agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, o con un vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado por su idoneidad con el modo de administración. Las composiciones se contemplan específicamente a la luz, por ejemplo, de la identificación de las proteínas de fusión que presentan propiedades mejoradas.

10 En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su solución en, o su suspensión en los vehículos líquidos antes de su inyección. Los liposomas se incluyen dentro de la definición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden estar presentes en la composición farmacéutica, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Se encuentra una discusión completa de los excipientes farmacéuticamente aceptables disponible en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995), Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins.

Los materiales de formulación aceptables preferentemente son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

20 La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener, o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o de liberación, la adsorción, o la penetración de la composición. Los materiales de formulación incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina, o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio, o sulfito ácido de sodio), reguladores (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos), agentes de volumen (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilen-diamina-tetra-acético (EDTA)), agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinil-pirrolidona, beta-ciclodextrina, o hidroxi-propil-beta-ciclodextrina), rellenos, monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa, o dextrinas), proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas), agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrofílicos (tales como polivinil-pirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contra-iones formadores de sales (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico, o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol, o polietilenglicol), alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, tensoactivos o agentes humectantes (tales como Pluronic; PEG; ésteres de sorbitán; polisorbato (tales como polisorbato 20 ó polisorbato 35 80; Triton; trometamina; lecitina; colesterol o tiloxapal), agentes mejoradores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes mejoradores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos; de preferencia cloruro de sodio o de potasio; o manitol o sorbitol), vehículos de administración, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª Edición, A. R. Gennaro, Editor, Mack Publishing Company 1990), y las siguientes ediciones del mismo.

40 La composición farmacéutica óptima se determinará por un experto dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración pretendida, del formato de suministro, y de la dosificación deseada (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*). Estas composiciones pueden tener influencia sobre el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo*, y la velocidad de eliminación *in vivo* de la proteína de fusión de la invención.

45 El vehículo o excipiente primario en una composición farmacéutica puede ser o bien de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado para inyección puede ser agua, solución salina fisiológica, o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en las composiciones para su administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos de ejemplo adicionales. Otras composiciones farmacéuticas de ejemplo comprenden tampón Tris de aproximadamente un pH de 7,0 a 8,5, o tampón de acetato de aproximadamente un pH de 4,0 a 5,5, el cual puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado. En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas de doble función se pueden preparar para su almacenamiento mediante la mezcla de la composición seleccionada que tenga el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente), en la forma de un polvo liofilizado para suspensión o de una solución acuosa. Además, el producto de la proteína de doble función se puede formular como un liofilizado 55 utilizando excipientes apropiados, tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas que contienen las proteínas de fusión de la invención se pueden seleccionar para su administración parenteral. Como alternativa, las composiciones se pueden seleccionar para su inhalación o para su administración a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la experiencia de la técnica.

- 5 Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, los tampones se utilizan para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente más bajo, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

10 Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en la presente invención pueden estar en la forma de una solución acuosa sin pirógeno parenteralmente aceptable, la cual comprende la proteína de doble función deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril, en donde se formula una proteína de doble función como una solución isotónica estéril conservada de forma adecuada. Otra preparación más puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (tales como políácido láctico o políácido glicólico), gránulos, o liposomas, que proporcionen la liberación controlada o sostenida del producto, el cual entonces se puede suministrar mediante de una inyección de depósito. También se puede utilizar ácido hialurónico, y esto puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de suministro de fármacos implantables.

20 En una realización, una composición farmacéutica se puede formular para inhalación. Por ejemplo, una proteína de doble función de la invención se puede formular como un polvo seco para inhalación. Las soluciones para inhalación de la proteína de doble función también se pueden formular con un propulsor para su suministro en aerosol. En otra realización más, las soluciones se pueden nebulizar. La administración pulmonar se describe además en la Publicación Internacional N.º WO 94/20069, la cual describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

25 También se contempla que ciertas formulaciones se pueden administrar por vía oral. En una realización de la presente invención, las proteínas de fusión de la invención que se administran de esta forma, se pueden formular con o sin los vehículos utilizados habitualmente en la composición de las formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula se puede diseñar para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Se pueden incluir agentes adicionales con el objeto de facilitar la absorción de las proteínas de fusión de la invención. También se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

35 Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de las proteínas de fusión de la invención en una mezcla con excipientes no tóxicos que sean adecuados para la elaboración de comprimidos. Mediante la disolución de los comprimidos en agua estéril, o en otro vehículo apropiado, las soluciones se pueden preparar en una forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes de enlace, tales como almidón, gelatina, o acacia; o agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco.

40 Las composiciones farmacéuticas adicionales que comprenden las proteínas de fusión de la invención, serán evidentes para los expertos en la materia, incluyendo las formulaciones que impliquen las proteínas de fusión de la invención en formulaciones de administración sostenida o controlada. Las técnicas para la formulación de una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como vehículos de liposomas, micropartículas bioerosionables, o granos porosos e inyecciones de depósito, también son conocidos por los expertos la materia (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO 93/15722, la cual describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas, y Wischke y Schwendeman, 2008, Int. J Pharm. 364: 298-327, y Freiberg y Zhu, 2004, Int. J Pharm. 282: 1-18, el cual describe la preparación y el uso de microesferas/micropartículas).

45 Los ejemplos adicionales de las preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en la forma de artículos configurados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (Patente de Estados Unidos N.º 3.773.919 y la Patente Europea N.º 0 058 481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-L-glutamato de etilo (Sidman y col., 1983, Biopolymers 22: 547-56), poli-(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer y col., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 y Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105), etileno / acetato de vinilo (Langer y col., citado anteriormente) o ácido poli-D-3-hidroxi-butírico (Patente Europea N.º 0 133 988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, los cuales se pueden preparar mediante cualquiera de varios procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Epstein y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 82: 3688-92; y las Patentes Europeas N.º 0 036 676, 0 088 046, y 0 143 949.

Las composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en la administración *in vivo* típicamente deben ser estériles. Esto se puede llevar a cabo mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando se liofiliza la composición, se puede llevar a cabo la esterilización empleando este procedimiento ya sea antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para su administración parenteral se puede almacenar en una forma liofilizada o en una solución. Además, las composiciones parenterales en términos generales se colocan en un recipiente que tenga una compuerta de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o frasco de solución intravenosa que tenga un tapón que se pueda perforar mediante una aguja para inyección hipodérmica.

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, se puede almacenar en frascos estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Estas formulaciones se pueden almacenar ya sea en una forma lista para su uso o bien en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiera de su reconstitución antes de la administración.

En una realización específica, la presente invención se refiere a kits para producir una unidad de administración de una sola dosis. Los kits pueden contener cada uno, tanto un primer recipiente que tenga una proteína seca, como un segundo recipiente que tenga una formulación acuosa. Dentro del alcance de esta invención también se incluyen kits que contengan jeringas previamente llenadas de una sola cámara y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).

Dosificaciones de las proteínas de fusión y administración de las mismas

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención que se deba emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del ámbito terapéutico y de los objetivos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, por lo tanto, variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, de la indicación para la cual se esté utilizando la variante de proteína de fusión, de la vía de administración, y del tamaño (peso corporal, superficie corporal, o tamaño del órgano) y la condición (la edad y la salud general) del paciente. De conformidad con lo anterior, el médico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 microgramo/kilogramo a aproximadamente 100 miligramos/kilogramo o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede estar en el intervalo de 0,1 microgramo/kilogramo a aproximadamente 100 miligramos/kilogramo; o de 1 microgramo/ kilogramo a aproximadamente 100 miligramos/kilogramo.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de doble función en la formulación que se esté utilizando. Típicamente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado. La composición, por lo tanto, se puede administrar como una sola dosis, como dos o más dosis (las cuales pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a través del tiempo, o como una infusión continua por medio de un dispositivo de implantación o de un catéter. El refinamiento adicional de la dosificación apropiada se hace habitualmente por los expertos en la materia, y está dentro del ámbito de las tareas que realizan habitualmente. Las dosificaciones apropiadas pueden ser aseveradas a través del uso de los datos de respuesta a la dosis apropiados.

La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con los procedimientos conocidos, por ejemplo, por vía oral; a través de inyección mediante la vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraarterial, intraportal, o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida (los cuales también se pueden inyectar); o mediante dispositivos de implantación. Cuando se desee, las composiciones se pueden administrar mediante inyección de bolo o de forma continua mediante infusión, o bien mediante un dispositivo de implantación.

Como alternativa o adicionalmente, la composición se puede administrar localmente por medio de la implantación de una membrana, esponja, u otro material apropiado sobre el cual se haya absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo se puede implantar en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser por medio de difusión, bolo de liberación temporizada, o mediante administración continua.

Usos terapéuticos de las proteínas de fusión

Las proteínas de la invención se pueden utilizar para tratar, diagnosticar, mitigar, o prevenir un número de enfermedades, trastornos, o afecciones, que incluyen, pero sin limitación, trastornos metabólicos. En una realización, el trastorno metabólico que se va a tratar es diabetes, por ejemplo, diabetes mellitus de tipo 2. En otra realización, el trastorno metabólico es obesidad. Otras realizaciones incluyen las afecciones o trastornos metabólicos, tales como diabetes mellitus de tipo 1, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglicemia, síndrome metabólico, hipertensión, enfermedad cardiovascular, infarto de miocardio

agudo, aterosclerosis, enfermedad de arterias periféricas, ictus, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad renal, complicaciones diabéticas, neuropatía, los trastornos asociados con mutaciones inactivadoras severas en el receptor de insulina y gastroparesis.

En la práctica, un trastorno o afección tal como diabetes mellitus de tipo 1 o de tipo 2 u obesidad, se puede tratar mediante la administración de una variante de proteína de FGF21 tal como se describe en el presente documento, a un paciente que lo necesite, en la cantidad de una dosis terapéuticamente eficaz. La administración se puede llevar a cabo tal como se describe en el presente documento, tal como mediante inyección intravenosa (IV), inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, u oralmente en la forma de una tableta o con formación de líquido. En la mayoría de las situaciones, una dosificación deseada se puede determinar por un médico, tal como se describe en el presente documento, y puede representar una dosis terapéuticamente eficaz del mutante del polipéptido de FGF21. Será evidente para los expertos en la materia que una dosis terapéuticamente eficaz del mutante del polipéptido de FGF21 dependerá, entre otras cosas, de la pauta de administración, de la dosis unitaria de antígeno administrada, de si la molécula de ácido nucleico o de polipéptido se administra en combinación con otros agentes terapéuticos, del estado inmunológico y de la salud del receptor. El término "dosis terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, significa la cantidad del mutante del polipéptido de FGF21 que provoque la respuesta biológica o medicinal en un sistema de tejidos, en un animal, o en un ser humano, que sea la buscada por un investigador, doctor, practicante, u otro médico, la cual incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o del trastorno que se esté tratando.

Habiendo descrito la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se incluyen en el presente documento para solo con fines ilustrativos, y no se pretende que sean limitantes de la invención.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, los procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, Editores, Academic Press, Inc.); y Handbook of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, Editores, 1986, Blackwell Scientific Publications); y Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Segunda Edición, 1989).

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de Proteínas Variantes de FGF21

Construcción de expresión para FGF21 V76: Las variantes de FGF21 se clonaron en el vector de expresión de *E.coli* modificado pET30a, descrito por Achmuller y col. (2007) (Nature Methods 4: 1037-1043), para generar fusiones en marco a un marcador de hexa-histidina, seguido por el marcador N^{pro}-EDDIE en el extremo N-terminal del FGF21 (aminoácidos 33-209).

Expresión y purificación de FGF21 V76: El plásmido de expresión pET30a-His-N^{pro}-EDDIE-FGF21 se transformó en células competentes de *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen). Durante la noche se llevó a cabo el cultivo a partir de una sola colonia de células recién transformadas en 50 mililitros de Terrific Broth (TB) que contenía 50 µg/ml de canamicina a 37 °C. El precultivo se transfirió a 1 litro del medio TB con canamicina, y se cultivó en matraces difusores a 37 °C con agitación a 250 revoluciones por minuto. Después de 6 horas de cultivo, se indujo la expresión del FGF21 mediante la adición de IPTG en una concentración final de 1 mM, y los cultivos se dejaron crecer durante la noche a 37 °C. Las células después se recolectaron y se volvieron a suspender en 50 ml de tampón de lisis helado; Tris-HCl 50 mM, a pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, seguido por lisis utilizando un MicrofluidizerTM.

Los cuerpos de inclusión (IB) se precipitaron mediante centrifugación a 30.000 x g durante 1 hora a 4 °C. Los cuerpos de inclusión (IB) se lavaron con Tris-HCl 50 mM, a pH 8, NaCl 150 mM y después se disolvieron en 30 ml de tampón de disolución; Tris-HCl 10 mM, a pH 8, NaH₂PO₄ 100 mM, GnHCl 6 M. Los cuerpos de inclusión (IB) disueltos se aclararon mediante centrifugación a 30.000 x g durante 1 hora a 25 °C. La solución de cuerpos de inclusión (IB) se cargó sobre una columna de 5 ml de resina de alto rendimiento de Ni-NTA (GE Healthcare) equilibrada con el tampón de disolución. Las proteínas enlazadas a la resina se eluyeron mediante la disminución del pH hasta 4,5. El eluato se acondicionó mediante el ajuste del pH y la adición de ditioeritrol (DTT), en una concentración de 20 mM. El eluato acondicionado se diluyó lentamente en 1 litro de tampón de repliegue; Tris-HCl 50 mM, a pH 8, arginina 0,5 M, DTT 20 mM, seguido por incubación durante 2 días a 4 °C. La muestra diluida se concentró y se le intercambió el tampón en Tris-HCl 20 mM, a pH 9 utilizando un procedimiento de ultrafiltración. La muestra concentrada se cargó sobre una columna de 10 ml de resina de flujo rápido Q Sepharose (GE Healthcare) equilibrada con Tris-HCl 20 mM (pH 9).

Después de lavar la resina con el tampón de calibración, las proteínas enlazadas a la resina se eluyeron con Tris-HCl 20 mM, a pH 9, NaCl 500 mM. Para remover el fragmento de fusión de His-N^{pro} disociado y cualquier proteína de fusión no disociada a partir de la proteína FGF21 replegada, el eluato se cargó sobre una columna de 5 ml de resina de alto rendimiento Ni-NTA calibrada con Tris 20 mM, a pH 8.0, imidazol 50 mM, y se recolectó la fracción de flujo atravesado que contenía FGF21. Para reducir los niveles de endotoxina, la fracción FGF21 se trató con una resina EndoTrap HD (Hyglos) calibrada con Tris 10 mM, a pH 8, imidazol 50 mM, NaCl 500 mM, CaCl₂ 1 mM. La muestra baja en endotoxina se dializó contra solución salina tamponada con fosfato (PBS), y después se esterilizó con un filtro de 0,22 µm. La proteína de FGF21 purificada se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido, y se almacenó a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante absorbancia a 280 nm utilizando 9362 M⁻¹ cm⁻¹ como el coeficiente de extinción molar para el FGF21. La pureza y la integridad de la proteína se determinaron mediante HPLC, SDS-PAGE y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas.

PEGilación de cisteína de las variantes de FGF21: La variante V76 de FGF21 (R154C) tiene tendencia a dimerizarse por medio de la cisteína diseñada; por lo tanto, antes de la PEGilación, la solución de proteína (típicamente 5 mg/ml en tampón Tris) se redujo suavemente con mercapto-etil-amina 5 mM durante 30 minutos sobre hielo, e inmediatamente se desalinizó en Tris 20 mM, a pH 7. La proteína recién reducida (típicamente 3 mg/ml) se PEGiló luego inmediatamente con 1,5 equivalentes de reactivo de maleimido-PEG ramificado de 40 kDa (NOF, n.º de cat. GL2-400MA de la serie Sunbright) durante 3 horas sobre hielo. La proteína PEGilada finalmente se purificó mediante cromatografía de intercambio de aniones (MonoQ) con rendimientos globales de aproximadamente el 25 %.

Construcciones de expresión para las variantes de la fusión de Fc-FGF21: Los ADNc para las variantes del FGF21 humano que codificaban los aminoácidos 33-209, se clonaron en un vector de expresión de mamífero aguas abajo del promotor de citomegalovirus (CMV) en marco, con las secuencias de N-terminal, incluyendo un péptido líder (cadena kappa de inmunoglobulina) para dirigir la secreción de las proteínas, seguido por un dominio Fc y un enlazador corto.

Expresión y purificación de las variantes de Fc-FGF21: Las proteínas variantes de Fc-FGF21 se expresaron en células HEK293T (American Type Culture Collection). Las células se cultivaron en un cultivo en suspensión a 37 °C, con CO₂ al 8 %, en el medio de expresión Freestyle 293 (Invitrogen, n.º de cat. 12338-018) hasta el día de la transfección. Las células se centrifugaron a 1000 xg durante 7 minutos en un rotor de cubeta oscilatorio, y se contaron utilizando un contador de células automatizado. Las células se diluyeron en 900 ml del medio Freestyle 293 hasta una concentración final de 1,4 x 10⁶ células/ml, y se colocaron en un matraz sin pantallas de 3 l (Corning, n.º de cat. 431252). Las células se transfectaron utilizando una mezcla de polietilenimina (PEI) y el plásmido tal como sigue. Se agregaron 3 ml de un suministro estéril de 1 mg/ml de polietilenimina (PEI) lineal, peso molecular de 25.000 (Alfa Aesar, n.º de cat. 43896), a 50 ml del medio Freestyle 293, se mezclaron suavemente, y se incubaron a 25°C durante 5 minutos. Al mismo tiempo, se agregó 1 mg de plásmido libre de endotoxina a 50 ml del medio Freestyle 293, y se esterilizó por filtración utilizando un filtro de 0,22 µm. La mezcla de polietilenimina (PEI) se agregó entonces al ADN filtrado estéril, se mezcló suavemente, y se dejó incubar a 25 °C durante 10 minutos. La mezcla de polietilenimina (PEI)-plásmido se agregó entonces al matraz de 3 l que contenía las células HEK 293T diluidas, y se colocó en una incubadora agitándose a 125 rpm, a 37 °C, con CO₂ al 8 %.

En el día 6 después de la transfección, las células se centrifugaron a 2000 xg durante 10 minutos, y se recolectó el sobrenadante. El sobrenadante se aclaró adicionalmente mediante filtración a través de un filtro de 0,8/0,2 µm (Pall Corporation, n.º de cat. 4628).

Se hizo la purificación por lotes de la proteína de FGF21 mediante la adición de 1 ml de Proteína A Recombinante-Sepharose Fast Flow (GE, n.º de cat. 17-5138-03), por 20 mg de la proteína esperada para purificarse, directamente al sobrenadante aclarado, e incubando durante 1 hora a 4 °C con rotación suave. La mezcla del sobrenadante se vertió entonces sobre una columna de cromatografía Poly-Prep desechable (Bio-Rad, n.º de cat. 731-1550), y se desechó el flujo atravesado. Los gránulos retenidos se lavaron con 5 volúmenes de la columna de DPBS, a pH 7,4 (Invitrogen, n.º de cat. 14190-144). La elución de la proteína a partir de los gránulos de proteína A se hizo mediante la adición de 20 volúmenes de la columna de tampón de citrato de sodio 50 mM, a pH 3,0. El tampón de elución se neutralizó mediante la adición del tampón de Tris-HCl al 20 %, a pH 9,0. Se llevó a cabo la cromatografía por exclusión de tamaños como un paso de pulido secundario, pasando el material purificado por lotes de Proteína A sobre una columna High Load 26/600 Superdex de 200 pg (GE, n.º de cat. 28-9893-36). El rendimiento de la proteína purificada se cuantificó por A280. Se ejecutó el SDS-Page para verificar la pureza y el peso molecular. El nivel de endotoxina se cuantificó utilizando el sistema Endosafe PTS (Charles River Labs).

Ejemplo 2: Medición de la absorción de 2-desoxiglucosa (2-DOG) dependiente del FGF21

Se ha demostrado que el FGF21 estimula la absorción de glucosa en los adipocitos 3T3-L1 de ratón en la presencia y en ausencia de insulina, y disminuye los niveles de glucosa, triglicéridos, y glucagón en sangre con alimento y en ayunas, en los ratones ob/ob y db/db y en ratas ZDF de 8 semanas de vida, de una manera dependiente de la dosis, proporcionando, por lo tanto, la base para el uso del FGF21 como una terapia para el tratamiento de diabetes y

obesidad (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente N.º WO03/011213, y Kharitononkov y col. (2005) Jour. of Clinical Invest. 115: 1627-1635). También, se observó que el FGF21 estimula la fosforilación de tirosina de FGFR-1 y FGFR-2 en los adipocitos 3T3-L1.

Los fibroblastos 3T3-L1 se adquirieron en ATCC (n.º de cat. CL173). Las células se cultivaron hasta la confluencia en una placa de Petri de 150 cm, y se mantuvieron en DMEM con un alto contenido de glucosa (Invitrogen, n.º de cat. 11995065) suplementado con suero bovino fetal al 10 % y penicilina-estreptomicina al 1 % durante 4 días adicionales. Las células entonces se diferenciaron en el medio anterior suplementado con 4 µg/ml de insulina (Sigma, n.º de cat. I-5500), 115 µg/ml de IBMX (Sigma, n.º de cat. #I5879), y 0,0975 g/ml de dexametasona (Sigma, n.º de cat. D1756) durante 3 días, después de lo cual, el medio de diferenciación se reemplazó con DMEM completo. Una placa de adipocitos 3T3-L1 diferenciados se sembró en cuatro placas de 96 pocillos el día después de que se reemplazó el medio.

Los adipocitos se trataron después con el FGF21 de tipo silvestre y con la proteína variante de FGF21 (véase la Tabla 2 para conocer la lista de variantes; el intervalo de concentración típico utilizado es de 30 pM a 100 nM) durante la noche en medio completo. Los adipocitos tratados con las muestras de FGF21 se agotaron de suero en 50 µl por pozo de tampón KRH (NaCl al 0,75 %; KCl al 0,038 %; CaCl₂ al 0,0196 %; MgSO₄ al 0,032 %; HEPES 0,025 M, a pH 7,5; albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 %; piruvato de sodio 2 mM) durante 2 horas. A los pocillos de referencia se les agregó 1 µl (concentración final de 5 g/ml) de citocalasina B durante 15 minutos. El [3H]-2-DOG (20,6 mCi/milimol, 1 mCi/ml) se diluyó a 1:20 en 2-DOG 5,1 mM frío, y se agregó 1 µl de 2-DOG diluido por pocillo, y las células se incubaron durante 5 minutos. Las células se lavaron con 100 µl/pocillo de tampón KRH tres veces. Se agregaron 40 µl/pocillo de SDS al 1 % a las células, y las células se agitaron durante al menos 10 minutos. Se agregaron 200 µl/pocillo de fluido de centelleo, y las placas se agitaron durante la noche, y se leyeron en un lector de microplacas-beta. Los valores obtenidos a partir de una columna/fila entera, la cual se trató con citocalasina B, se promediaron y se sustrajeron de todos los demás valores. Los datos se analizaron mediante el programa informático GraphPad Prism, cuyos resultados se resumen en la Tabla 2. Las variantes V101, V103 y V188 de la fusión de Fc-FGF21 son superiores a la variante V76 de FGF21 PEGilada para la inducción de la absorción de 2-desoxi-glucosa por parte de los adipocitos 3T3L1 de ratón.

Ejemplo 3: Ensayo In Cell Western (ICW) de pERK

Las células HEK293 transfectadas de forma estable con β-klotho humano se cultivaron en DMEM alto en glucosa, suero bovino fetal (FBS) al 10 %, PS al 1 %, y 600 ng/ml de G418, y se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (BD Bioscience, n.º de cat. 356640) a 30.000 células por pocillo durante la noche. Las células se agotaron de suero en DMEM alto en glucosa, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 %, y HEPES 10 mM durante 4 horas. El FGF21 de tipo silvestre y las variantes de FGF21 (véase la Tabla 3 para conocer una lista de las variantes) se diluyeron hasta diversas concentraciones (el intervalo de concentración típico utilizado es de 100 pM a 300 nM) en el medio de agotamiento. Las células se estimularon con el FGF21 durante 10 minutos. Tras la estimulación con el FGF21 o con la variante de proteína de FGF21, el medio se aspiró de los pocillos, y las células se lavaron una vez con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría, y después se fijaron con 100 µl de formaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, y seguidos por una incubación adicional durante 10 minutos con 100 µl de metanol helado.

Después de la fijación, las células se lavaron con Triton X-100 al 0,3 % en solución salina tamponada con fosfato cuatro veces, durante 5 minutos cada una. Se añadieron 150 µl de tampón de bloqueo Odyssey a las células permeabilizadas a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El anticuerpo de Fosfo-ERK (pERK) se diluyó hasta una concentración de 0,17 µg/ml (dilución a 1:200, o las diluciones indicadas), y el anticuerpo ERK-total (tERK) se diluyó hasta una concentración de 2,2 µg/ml (dilución a 1:200, o las diluciones indicadas) en tampón de bloqueo Odyssey. Se agregaron 50 µl a cada pocillo, omitiendo una columna que solamente se trató con el anticuerpo secundario para normalizar el fondo. La placa se cubrió con la toalla de papel húmeda y la tapa para prevenir la evaporación, y entonces se incubó a 4 °C durante la noche.

Después, el anticuerpo primario se aspiró, y las células se lavaron cuatro veces con Tween 20 al 0,3 % en solución salina tamponada con fosfato durante 5 minutos cada una. Durante el lavado, se preparó la mezcla de reacción del anticuerpo secundario en el tampón de bloqueo Odyssey que contiene Alexa 680 de cabra anti-ratón diluido a 1:1.000 (o a las diluciones indicadas), y anticuerpo de cabra anti-conejo IRDye800 diluido a 1:1.000 (o a las diluciones indicadas). Una vez que se completó el lavado, se agregaron 40 µl de la mezcla de reacción a cada pocillo. Las placas se cubrieron con una tapa negra para proteger al anticuerpo secundario de la luz, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora sobre un agitador. Finalmente, las células se lavaron nuevamente cuatro veces con Tween 20 al 0,3 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 5 minutos cada una, y entonces se escanearon en el Sistema de Imágenes Infrarrojas LI-COR Bioscience Odyssey (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) en los canales de 700 nm (rojo), y de 800 nm (verde). El Alexa 680 tiñó el tERK con fluorescencia muy roja (longitud de onda de emisión de 668 nm), mientras que el IRDye800 tiñó el pERK con fluorescencia verde (longitud de onda de emisión de 800 nm). Para eliminar el fondo fluorescente, los valores obtenidos a partir de una columna/fila entera, la cual se trató con solamente el anticuerpo secundario, se promediaron y se sustrajeron a partir

de todos los demás valores obtenidos a partir de la placa. Para la normalización de la cantidad de pERK presente en cada muestra, los valores para pERK en cada pozo se dividieron entre los valores de tERK. Los datos se analizaron mediante el programa informático GraphPad Prism, cuyos resultados se resumen en la Tabla 2. Las variantes V101, V103 y V188 de la fusión de Fc-FGF21 son superiores a la variante V76 de FGF21 PEGilada en este ensayo de fosforilación de ERK.

Tabla 2: Compendio de los resultados del ensayo In Cell Western de ERK y de absorción de glucosa de adipocitos 3T3L1 de ratón

ID de Variante de FGF21	pERK (HEK293/β-klotho humano) CE ₅₀ ± EEM	Absorción de Glucosa (Adipocitos 3T3L1 de Ratón) CE ₅₀ ± EEM
V76	13 ± 4 nM (n = 5)	5 ± 1 nM (n = 3)
V101	0,60 ± 0,06 nM (n = 5)	0,60 ± 0,06 nM (n = 3)
V103	0,9 ± 0,3 nM (n = 5)	0,60 ± 0,07 nM (n = 3)
V188	0,4 ± 0,1 nM (n = 3)	0,48 ± 0,14 nM (n = 3)

Ejemplo 4: Pruebas *In Vivo* de las Variantes de FGF21

El ratón *ob/ob* es un modelo de ratón para diabetes de tipo 2. Los ratones carecen de leptina funcional y se caracterizan por hiperglucemia, resistencia a la insulina, hiperfagia, esteatosis hepática, y obesidad. Se utilizaron ratones *ob/ob* machos (de 10 a 13 semanas de vida), para medir el efecto sobre la glucosa en sangre de la siguiente variante V76 de FGF21 PEGilada y las variantes V101, V103 y V188 de la fusión de Fc-FGF21.

Las variantes de FGF21 o el vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se administraron por vía subcutánea (s.c.) a 1 mg/kg (V101, V103 y V188) o por vía subcutánea (s.c.) en 5 mg/kg de V76 dos veces por semana durante 12 días (4 dosis en total). En el primer día del estudio, se midieron la glucosa en sangre de la cola y el peso corporal, y los ratones se asignaron a diferentes grupos (n = 8 por grupo) concordando la glucosa y el peso corporal promedio entre los grupos. La glucosa en sangre se midió utilizando un glucómetro (OneTouch). La insulina en plasma se midió en el día 1 antes de la dosificación, y en el día 12, 24 horas después de la última dosis. Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 5.

Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 3 y en las Figuras 1 a 3. Las variantes V101, V103 y V188 de la fusión de Fc-FGF21 son superiores a la variante V76 de FGF21 PEGilada en cada punto final medido en estos estudios, y en una dosis cinco veces más baja.

Tabla 3. Porcentaje de cambios contra el vehículo en glucosa en plasma, insulina, ganancia de peso corporal (PC), y TG/lípidos en hígado, por las variantes de FGF21 durante los estudios de 12 días en los ratones *ob/ob*.

Resumen del estudio del tratamiento de 12 días en ratones diabéticos <i>ob/ob</i> (% de cambio del vehículo)					
ID de Variante de FGF21	Dosis (mg/kg)	Glucosa Total (ABC)	Insulina en Plasma	Peso Corporal	Lípidos en Hígado
V76	5,0	-42 %	-46 %	-7 %	-30 %
V101	1,0	-53 %	-82 %	-12 %	-44 %
V103	1,0	-46 %	-69 %	-12 %	-50 %
V188	1,0	-42 %	-59 %	-11 %	-51 %

Ejemplo 5: Farmacocinética de las Variantes de Fusión de FGF21 en los Ratones

Con el fin de determinar el perfil farmacocinético de las variantes V101, V103 y V188 de la fusión de Fc-FGF21, se inyectó a los ratones C57BL/6J por vía intravenosa (i.v.) con 1 mg/ kg del artículo de prueba, y se sangraron en diversos puntos temporales de 16 días (384 horas). Se recolectaron muestras de sangre en tubos Microtainer recubiertos con EDTA a partir del plexo submandibular o retroorbital. Se recolectaron aproximadamente 50 µl de sangre en cada punto temporal, proporcionando -25 µl de plasma.

Para medir las concentraciones en plasma de los artículos de prueba mediante ELISA, las placas de 384 pocillos se recubrieron durante la noche a temperatura ambiente (TA) con 2 µg/ml del anticuerpo policlonal de cabra Fc-Gamma anti-humano (30 µl/pocillo), y entonces se bloquearon con un diluyente basado en caseína durante 2 horas a temperatura ambiente (100 µl/pocillo). Se agregaron a la placa las muestras diluidas, los estándares, y los controles (30 µl/pocillo), y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de que se removieron las muestras, los pocillos se lavaron 3 veces con una solución de lavado a base de fosfato (100 µl/pozo). Se agregó a la placa el anticuerpo de detección, una versión marcada con HRP del anticuerpo de captura, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (30 µl/pocillo). Después de que la placa se lavó nuevamente 3 veces con una solución de lavado basada en fosfato (100 µl/pocillo), se agregó un sustrato quimioluminiscente (30 µl/pocillo), y se leyó la luminiscencia de la placa dentro de 5 minutos utilizando un lector de placas apropiado. Tal como se muestra en las Figuras 4A y 4B, las variantes de fusión de Fc-FGF21 tuvieron una vida media en plasma muy extendida en relación con las fusiones de Fc-FGF21 conocidas en la técnica (Figura 4A), y en relación con la variante V76 de FGF21 PEGilada (Figura 4B).

Los niveles en suero de los artículos de prueba de Fc-FGF21 se validaron mediante análisis por transferencia de Western para su comparación con los niveles medidos mediante ELISA, con el fin de asegurar que se detectara la variante de Fc-FGF21 de longitud completa, y no el Fc solo, en el ELISA. Se combinaron 2 µl de suero de ratón con 2,5 microlitros del regulador de carga a 4X, 1 µl de desnaturizante a 10X, y 4 µl de dH₂O, se calentaron hasta 95 °C durante 5 minutos, y se cargaron sobre un gel de poliacrilamida en un gradiente del 4 al 12 %, y se pasaron por electroforesis durante 1 hora a 100 V (voltaje constante). Las muestras se transfirieron a un papel filtro de nitrocelulosa mediante análisis por transferencia de Western utilizando el sistema Iblot (Invitrogen, n.º de cat. IB1001, tiempo de ejecución de 7 minutos). Los filtros de nitrocelulosa se bloquearon con 30 ml de solución bloqueadora Rockland (n.º de cat. MB-070), se sondearon en seguida del protocolo del sistema Iblot instantáneo con un anticuerpo primario de cabra anti-FGF21 en una dilución de 1:2.000 (R&D Systems, n.º de cat. BAF2539), y estreptavidina fluorescentemente marcada como un material secundario en una dilución de 1:10.000 (Licor, n.º de cat. 926-68031). Se tomaron imágenes de los niveles de proteínas en el sistema Licor Odyssey a 700 nm, y se compararon con el control V101 2 mM ejecutado sobre el mismo gel. Tal como se muestra en la Figura 4C, las variantes V101, V103 y V188 del Fc-FGF21 de longitud completa son detectables utilizando un anticuerpo anti-FGF21 en el análisis por transferencia de Western hasta 15 días, a partir del suero de ratón del estudio farmacocinético.

Ejemplo 6: Las Variantes V101, V103 y V188 de la Fusión de Fc-FGF21 son extremadamente termodinámicamente estables

Las proteínas se pueden desplegar en un intervalo de temperatura específico. La temperatura del despliegue de la proteína es un parámetro intrínseco para describir la estabilidad térmica de las proteínas. Se utiliza la calorimetría de exploración diferencial (DSC) para detectar la temperatura de despliegue de la proteína. Esta temperatura característica se describe como la temperatura de fusión (T_m), la cual es la temperatura máxima durante el despliegue de la proteína.

Las muestras de proteína originales se diluyen en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml (de 0,5 mg/ml a 1,2 mg/ml) para un volumen total de 0,5 ml. Se agrega una alícuota de 0,4 ml por pocillo de muestra de proteína diluida, estándar, solución salina tamponada con fosfato (PBS), y agua desionizada (DI) a una placa de calorimetría de exploración diferencial (DSC) de 96 pocillos. Después se cubre la placa con un sello. Las muestras se analizaron en un calorímetro de exploración diferencial de 96 pocillos de MicroCal. La temperatura se exploró de 10 °C a 110 °C a una velocidad de 1 grado por minuto.

Tal como se muestra en la Figura 4D, las temperaturas de fusión de las variantes V101, V103 y V188 de FGF21 son extremadamente altas. Esto está en contraste con las temperaturas de fusión más bajas de la variante V76 de FGF21 y el FGF21 de tipo silvestre (no se muestra). Los presentes inventores atribuyen la mayor estabilidad de V101, V103 y V188 a la adición específica de un segundo enlace de disulfuro a partir de las mutaciones novedosas Q55C y G148C. Se sabe que este tipo de estabilidad termodinámica protege a las proteínas de la proteólisis y, además, se puede traducir en una estabilidad significativamente prolongada *in vivo*, y en los mejores perfiles farmacocinéticos ejemplificados por los datos de las Figuras 4B y 4C.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Boettcher, Brian Daniels, Doug Caplan, Shari Hamamatsu, Norio Weldon, Stephen Licht, Stuart

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS METABÓLICOS

<130> PAT054783

<150> 61/539280

<151> 26-09-2011

<160> 13

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

5

<210> 1

<211> 209

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 1

```

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

```

15

<210> 2

<211> 940

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 2

```

ctgtcagctg aggatccagc cgaaagagga gccaggcact caggccacct gagtctactc 60
acctggacaa ctggaatctg gcaccaattc taaaccactc agcttctccg agctcacacc 120
ccggagatca cctgaggacc cgagccattg atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac 180
tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt cttctgctgg gaggctgcca ggcacacccc 240
atccctgact ccagtccctc cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac 300
acagatgatg cccagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gacgggtggg 360
ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt 420
attcaaactc tgggagtcaa gacatccagg ttctgtgcc agcgccaga tggggccctg 480
tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac 540
ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac ggctcccgc tgcacctgcc agggacaag 600
tccccacacc gggaccctgc accccgagga ccagctcgt tcctgccact accaggcctg 660
ccccccgcac tcccggagcc accccgaatc ctggccccc agcccccca tgtgggctcc 720
tcggacctc tgagcatggt gggaccttcc cagggccgaa gcccagcta cgcttctga 780
agccagaggc tgtttactat gacatctcct ctttatttat taggttattt atcttattta 840
tttttttatt tttcttactt gagataataa agagttccag aggagaaaaa aaaaaaaaaa 900
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 940

```

<210> 3
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

5

```

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

```

10

<210> 4
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

15

ES 2 689 762 T3

```

caccocatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtcog gcagcgggtac 60
ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gccacactgg agatcaggga ggatgggacg 120
gtggggggcg ctgctgacca gagcccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg 180
ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg 240
gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttcggga gctgcttctt 300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacggcc tcccgctgca cctgccaggg 360
aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctcgcttcct gccactacca 420

ggcctgcccc ccgcactccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg 480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct 540
tcctga 546

```

5 <210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

	Met	Asp	Ser	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Glu	His	Ser	Gly	Leu	Trp	Val	Ser
	1				5					10					15	
	Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Gln	Ala				
10				20				25								

15 <210> 6
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6
 ggggsggggs ggggs 15

20 <210> 7
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 7

```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1      5      10      15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20      25      30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35      40      45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50      55      60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65      70      75      80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85      90      95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100     105     110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115     120     125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130     135     140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145     150     155     160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165     170     175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180     185     190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195     200     205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210     215     220
Pro Gly Lys Gly Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 225     230     235     240
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 245     250     255
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 260     265     270
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 275     280     285
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 290     295     300
Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 305     310     315     320
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 325     330     335
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
 340     345     350
Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 355     360     365
Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 370     375     380
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 385     390     395     400
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 405

```

<210> 8

<211> 419

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Asp 1	Lys	Thr	His	Thr 5	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro 10	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala 15	Gly
Gly	Pro	Ser	Val 20	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 25	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 30	Leu	Met
Ile	Ser	Arg 35	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 40	Cys	Val	Val	Val	Asp 45	Val	Ser	His
Glu	Asp 50	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 55	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 60	Gly	Val	Glu	Val
His 65	Asn	Ala	Lys	Thr 70	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 75	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 80
Arg	Val	Val	Ser 85	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His 90	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly 95
Lys	Glu	Tyr	Lys 100	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 105	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 110	Pro	Ile
Glu	Lys 115	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 120	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 125	Pro	Gln	Val
Tyr	Thr 130	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu 135	Glu	Met	Thr	Lys 140	Asn	Gln	Val	Ser
Leu 145	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 150	Tyr	Pro	Ser	Asp 155	Ile	Ala	Val	Glu 160
Trp	Glu	Ser	Asn 165	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 170	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro 175
Val	Leu	Asp	Ser 180	Asp	Gly	Ser	Phe 185	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 190	Thr	Val
Asp	Lys	Ser	Arg 195	Trp	Gln	Gln	Gly 200	Asn	Val	Phe	Ser	Cys 205	Ser	Val	Met
His 210	Glu	Ala	Leu	His	Asn 215	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 220	Leu	Ser	Leu	Ser
Pro 225	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly 230	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly 235	Ser	Gly	Gly	Gly 240
Gly	Ser	Asp	Ser 245	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe 250	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln 255
Arg	Tyr	Leu	Tyr 260	Thr	Asp	Asp	Ala 265	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His 270	Leu	Glu
Ile	Arg	Glu 275	Asp	Gly	Thr	Val	Gly 280	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln 285	Ser	Pro	Glu
Ser 290	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala 295	Leu	Lys	Pro	Gly	Val 300	Ile	Gln	Ile	Leu
Gly 305	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe 310	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro 315	Asp	Gly	Ala	Leu 320
Tyr	Gly	Ser	Leu 325	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala 330	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu 335
Leu	Leu	Glu	Asp 340	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln 345	Ser	Glu	Ala	His 350	Gly	Leu
Pro	Leu	His 355	Leu	Pro	Gly	Asn 360	Lys	Ser	Pro	His	Arg 365	Asp	Pro	Ala	Pro
Arg 370	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe 375	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu 380	Pro	Pro	Ala	Leu
Pro 385	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile 390	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro 395	Asp	Val	Gly	Ser 400
Ser	Asp	Pro	Leu 405	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser 410	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser 415
Tyr	Ala	Ser													

<210> 9

<211> 177

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

Ser

<210> 10
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1				5					10					15	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20					25				30			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His

	35					40					45				
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	50					55					60				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
			165					170						175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	210					215					220				
Pro	Gly	Lys	Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln
225					230					235					240
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Gln	Thr	Glu	Ala
			245					250						255	
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln
			260					265					270		
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
		275					280					285			
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp
	290					295					300				
Gly	Thr	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe
305					310					315					320
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala
			325						330					335	
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Asp
			340					345					350		
Pro	Ala	Ser	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro
		355					360					365			
Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp
	370					375					380				
Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Arg
385					390					395					400

<210> 11
<211> 406
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1				5				10					15		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20				25					30			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		35					40					45			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	50					55					60				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				165					170					175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	210					215					220				
Pro	Gly	Lys	Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln
				230						235					240
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Gln	Thr	Glu	Ala
				245					250					255	
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln
			260					265					270		
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
		275					280					285			
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Lys	Pro	Asp
	290					295					300				
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe
	305					310				315					320
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala
				325					330					335	
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Asp
			340					345					350		
Pro	Ala	Ser	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro
		355					360					365			
Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp
	370					375					380				
Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Arg
	385				390					395					400
Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser										
				405											

<210> 12
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1				5					10				15		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20				25					30			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		35					40					45			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	50				55					60					
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90				95		
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
			165					170						175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
		180						185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	210				215						220				
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
225					230					235					240
Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln
			245					250						255	
Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu
		260						265					270		
Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu
	275						280					285			
Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu
	290				295					300					
Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu
305					310					315					320
Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu
			325					330						335	
Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu
		340						345					350		
Pro	Leu	His	Leu	Pro	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Ser
	355					360						365			
Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu
	370					375					380				
Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser
385					390				395						400
Ser	Asp	Pro	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser
			405					410						415	
Tyr	Ala	Ser													

<210> 13
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1				5					10					15	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20					25					30		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		35					40					45			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	50					55					60				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		130				135					140				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
			165						170					175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
		210			215						220				
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
225				230						235					240
Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln
			245						250					255	
Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu
		260						265					270		
Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu
		275					280					285			
Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu
		290			295						300				
Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Thr	Leu
305				310						315					320
Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu
				325					330					335	
Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu
		340						345					350		
Pro	Leu	His	Leu	Pro	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Ser
		355					360					365			
Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu
	370				375						380				
Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser
385				390						395					400
Ser	Asp	Pro	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser
				405					410					415	
Tyr	Ala	Ser													

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende una variante de FGF21 y una región Fc, en donde la secuencia de dicha proteína se selecciona de una secuencia enumerada como sigue

SEQ ID NO:	Secuencia	Nombre*
10	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSTIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGS D SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGTLYGS LHFDPACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSDDP LAMVGGSOAR SPSYAS	Variante n.º 101 = Fusión de Fc en N-terminal con el enlazador de 2 AA (GS) entre Fc y FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
11	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSTIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGS D SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QKPDGALYGS LHFDPACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSDDP LAMVGGSOAR SPSYAS	Variante n.º 103 = Fusión de Fc en N-terminal con el enlazador de 2 AA (GS) = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
12	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSTIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG GSDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQKPDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPCNR SPHRDPASRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGGG QARSPSYAS	Variante n.º 188 = V103 con el enlazador de 15 AA (GGGG x 3) entre Fc y FGF21 = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

SEQ ID NO:	Secuencia	Nombre*
13	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG <u>GSGGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPEL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGT L YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLP CNR SPHRDPASRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPL AMVGGG Q ARSPSYAS	Variante n.º 204 = V101 con el enlazador de 15 AA (GGGS x 3) entre Fc y FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

2. La proteína de fusión tal como se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de trastornos asociados con la FGF21, seleccionados a partir del grupo que consiste en obesidad, diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), estatohepatitis no alcohólica (NASH), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, infarto de miocardio agudo, hipertensión, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, enfermedad de arterias periféricas, ictus, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad renal, complicaciones diabéticas, neuropatía, gastroparesis y trastornos asociados con mutaciones inactivadoras severas en el receptor de insulina.

3. Composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión tal como se reivindica en la reivindicación 1 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.

4. Composición farmacéutica tal como se reivindica en la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico.

5. Polinucleótido que codifica la proteína de fusión tal como se reivindica en la reivindicación 1.

6. Vector que contiene el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5.

7. Célula hospedadora que lleva el vector de acuerdo con la reivindicación 6.

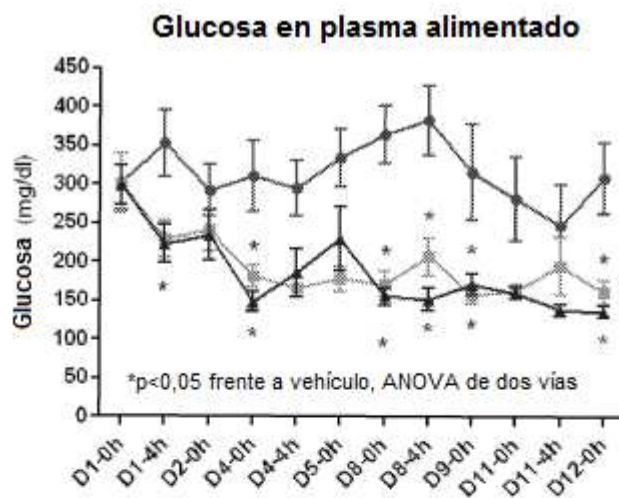


FIG 1A

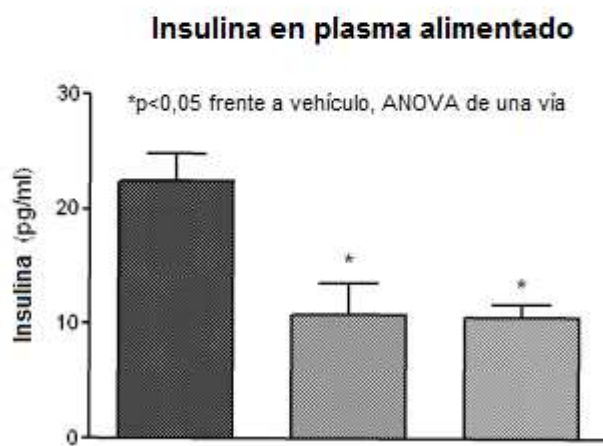


FIG 1B

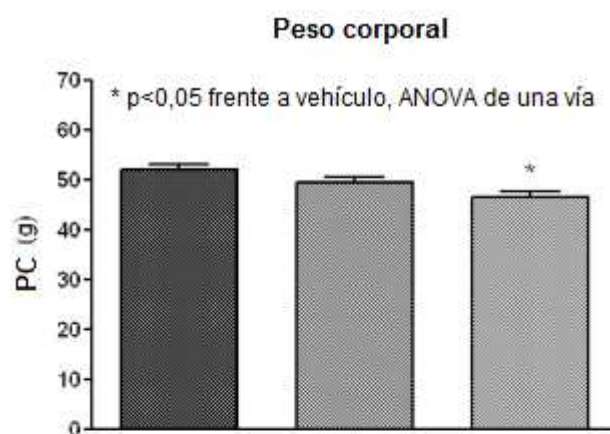


FIG 1C

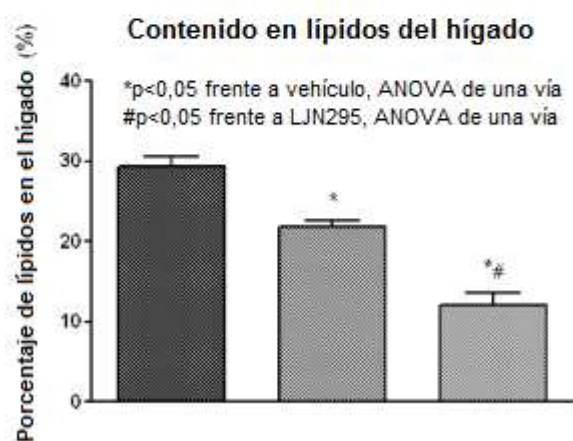


FIG 1D

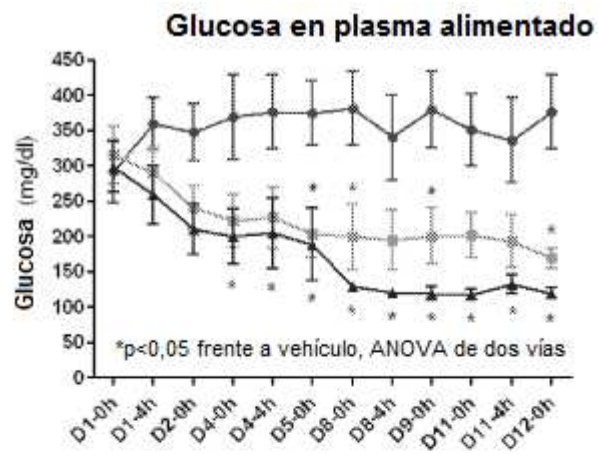


FIG 2A

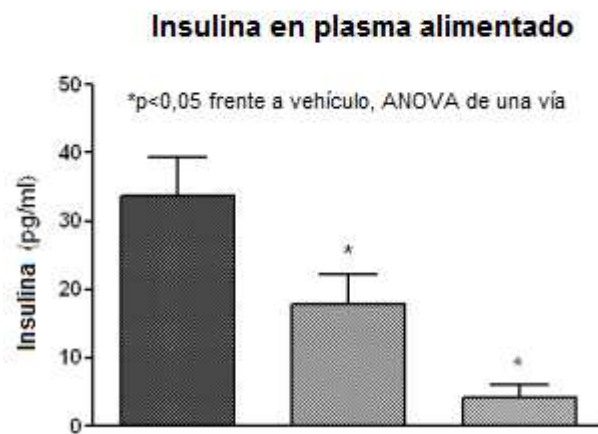


FIG 2B

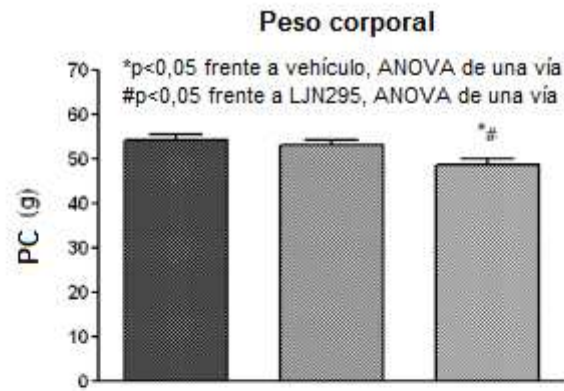


FIG 2C

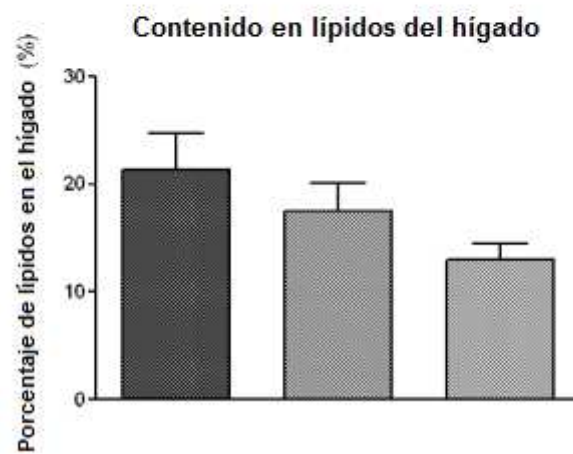


FIG 2D

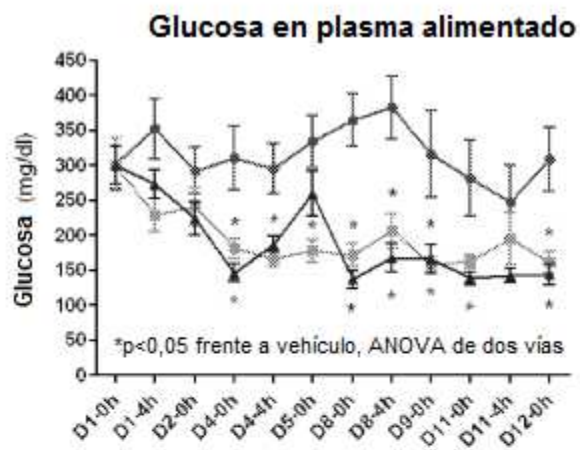


FIG 3A

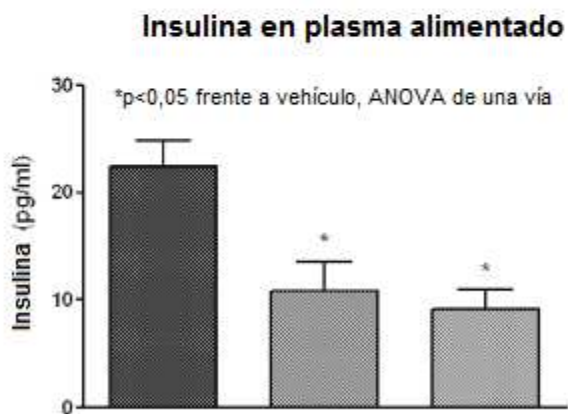


FIG 3B

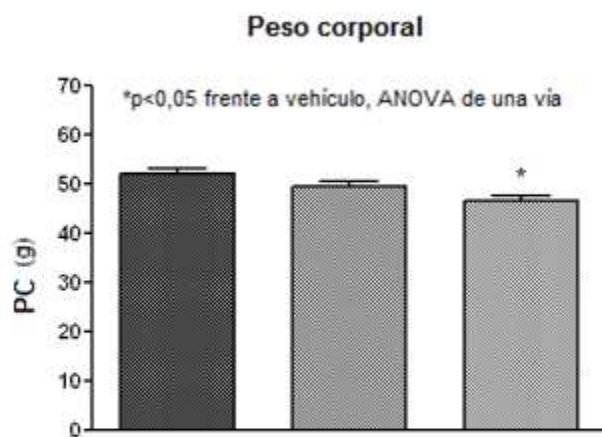


FIG 3C

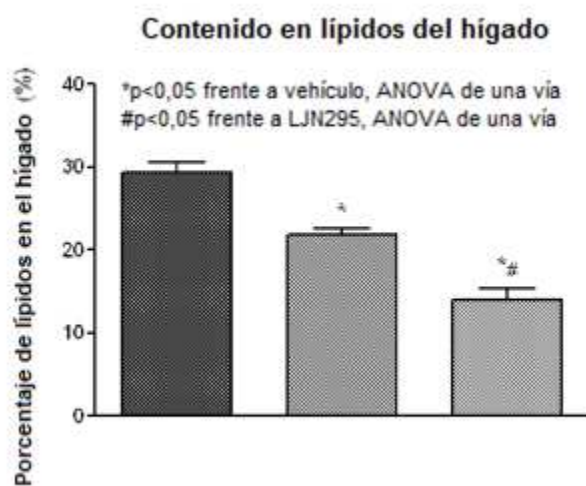


FIG 3D

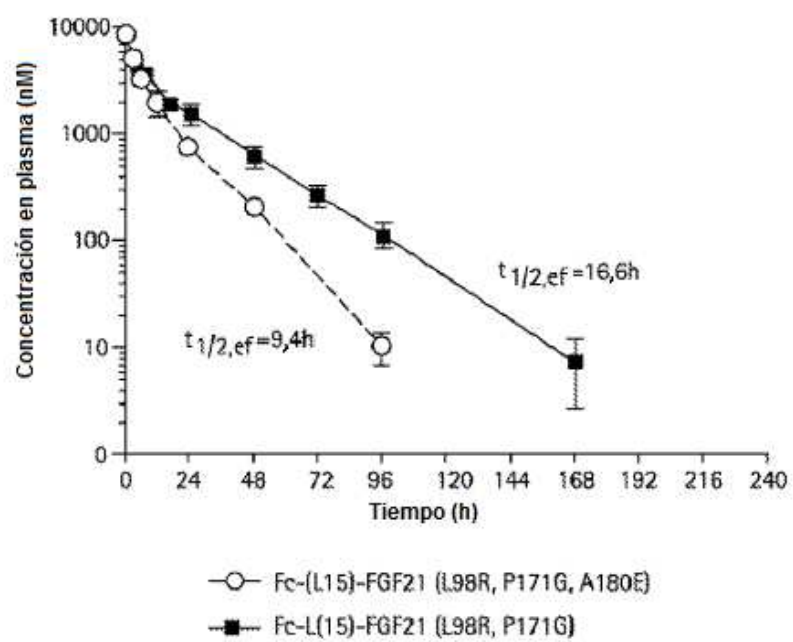


FIG 4A

Dosis única de ratón PK IV1 mg/kg

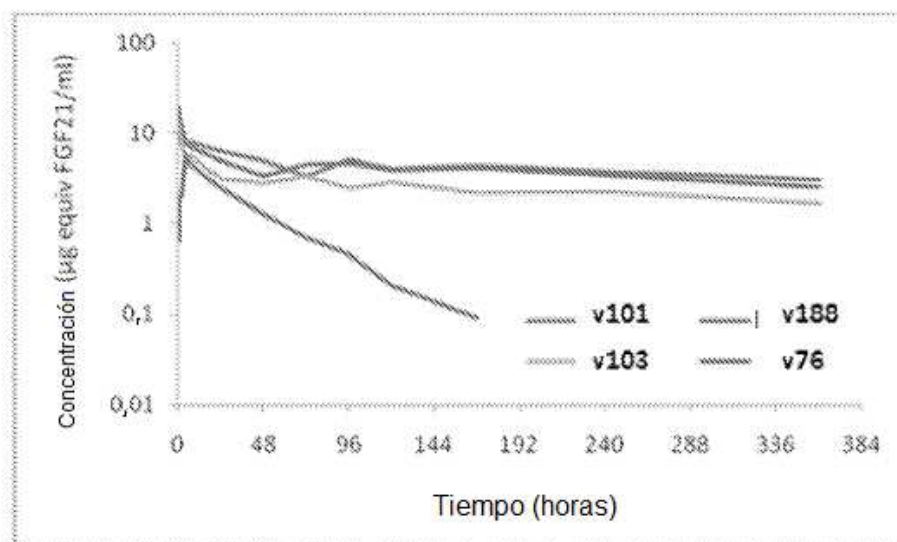


FIG 4B

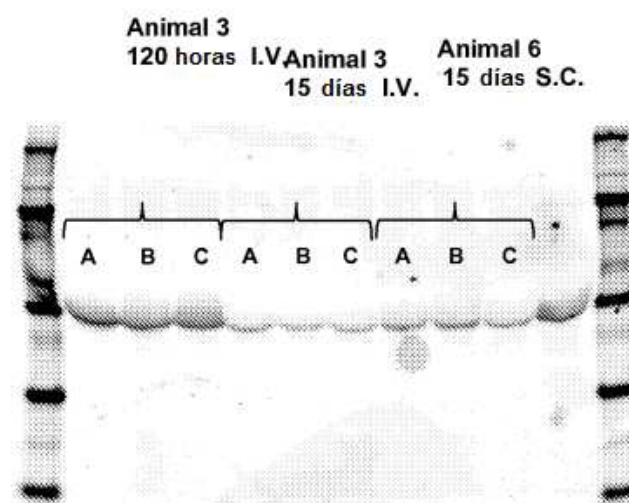


FIG 4C

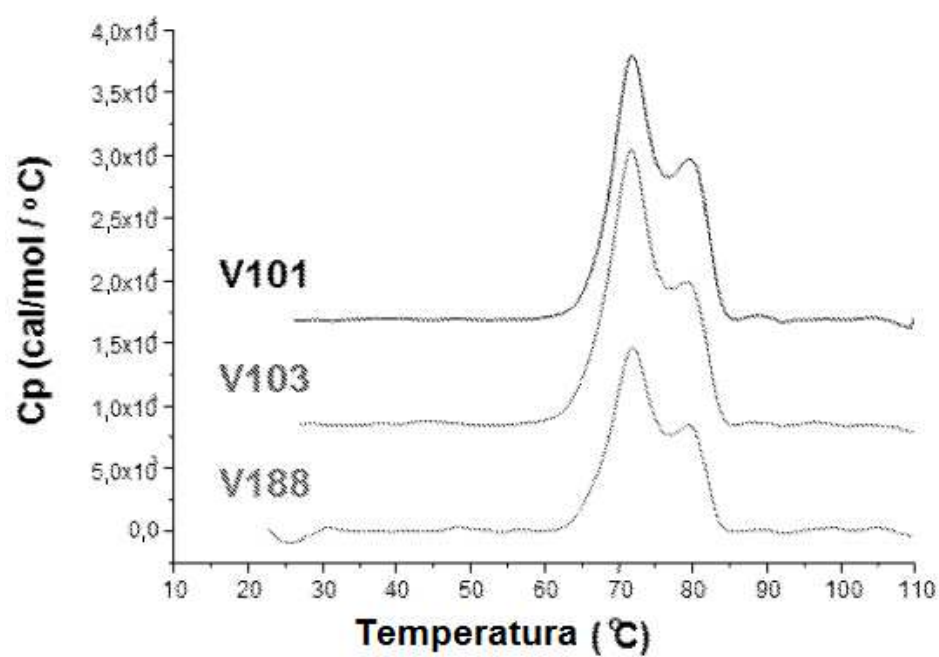


FIG4D