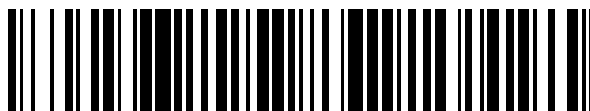


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 038**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/50 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012** **PCT/US2012/045087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013** **WO13006486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012** **E 12807786 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019** **EP 2726511**

54 Título: **Composiciones, usos y métodos para el tratamiento de trastornos y enfermedades metabólicos**

30 Prioridad:

01.07.2011 US 201161504128 P

04.08.2011 US 201161515126 P

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

12.03.2020

73 Titular/es:

NGM BIOPHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
333 Oyster Point Blvd.
South San Francisco CA 94080 , US

72 Inventor/es:

LING, LEI y
LINDHOUT, DARRIN, A.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 748 038 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

Composiciones, usos y métodos para el tratamiento de trastornos y enfermedades metabólicos

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere al factor de crecimiento de fibroblastos quimérico 19 (FGF19) y a las secuencias peptídicas del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) con actividad de reducción de glucosa, y métodos y usos en el tratamiento de la hiperglucemia y otros trastornos.

Introducción

- 10 La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica debilitante causada por la falta de producción de insulina (tipo 1) o la resistencia a la insulina o una producción insuficiente de insulina (tipo 2) desde las células pancreáticas. Las células β son células endocrinas especializadas que fabrican y almacenan insulina para su liberación después de las comidas. La insulina es una hormona que facilita la transferencia de glucosa desde la sangre a los tejidos donde se necesita. Los pacientes con diabetes deben controlar con frecuencia los niveles de glucosa en sangre y muchos requieren múltiples inyecciones diarias de insulina para sobrevivir. Sin embargo, estos pacientes rara vez alcanzan niveles ideales de glucosa a través de la inyección de insulina (Turner, R.C. et al. JAMA 281:2005(1999)). Además, una elevación prolongada de los niveles de insulina puede dar lugar a efectos secundarios perjudiciales como el shock hipoglucémico y la desensibilización de la respuesta del cuerpo frente a la insulina. En consecuencia, los pacientes diabéticos siguen desarrollando complicaciones a largo plazo, como enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales, ceguera, daño a los nervios y trastornos en la cicatrización de las heridas (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS), Lancet 352:837 (1998)).
- 20 La cirugía bariátrica se ha propuesto como un tratamiento potencial para la diabetes. Se ha postulado que los cambios en la secreción de hormonas intestinales después de la cirugía son responsables de la resolución de las condiciones diabéticas. El mecanismo molecular subyacente aún no se ha aclarado, aunque se ha especulado con el péptido 1 tipo glucagón (GLP-1) como posible candidato (Rubino, F. Diabetes Care 32 Suppl 2:S368(2009)). FGF19 está muy expresado en el intestino delgado distal y la sobreexpresión transgénica de FGF19 mejora la homeostasis de la glucosa (Tomlinson, E. Endocrinology 143(5):1741-7(2002)). Los niveles séricos de FGF19 en los seres humanos son elevados después de la cirugía de bypass gástrico. La expresión aumentada y la secreción de FGF19 podrían explicar, al menos parcialmente, la remisión de la diabetes experimentada después de la cirugía.

- 30 El documento WO 2010/148142 A1 se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos quiméricos, polipéptidos quiméricos, composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos quiméricos, y métodos para el tratamiento de trastornos metabólicos como la diabetes y la obesidad utilizando tales ácidos nucleicos, polipéptidos o composiciones farmacéuticas. Ai-Luen Wu et al. (PLoS ONE, Vol. 6, nº 3, 1 de enero de 2011, e17868) se refiere a FGF19, su receptor y su papel en la carcinogénesis hepatocelular.

- 35 En consecuencia, son necesarios tratamientos alternativos de afecciones hiperglucémicas como diabetes, prediabetes, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa o síndrome metabólico, y otros trastornos y enfermedades asociados con niveles de glucosa elevados en seres humanos. La invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas.

Sumario

- 40 En un primer aspecto, la invención proporciona un péptido quimérico que comprende o consiste en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:69, o SEQ ID NO:70. En una realización, el péptido quimérico comprende o consiste en SEQ ID NO:2. En otra realización, el péptido quimérico comprende o consiste en SEQ ID NO:52. En otra realización, el péptido quimérico comprende o consiste en SEQ ID NO:53. En otra realización, el péptido quimérico comprende SEQ ID NO:70. En otra realización, el péptido quimérico consiste en SEQ ID NO:70. En otra realización, el péptido quimérico comprende SEQ ID NO:69. En otra realización, el péptido quimérico consiste en SEQ ID NO:69. En una realización adicional, el péptido quimérico se fusiona con una región de inmunoglobulina Fc.

- 45 En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido quimérico del primer aspecto. En una realización, la composición farmacéutica comprende un agente reductor de glucosa.

- 50 En un tercer aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido quimérico del primer aspecto, en el que la molécula de ácido nucleico comprende además un elemento del control de la expresión en la unión operativa que confiere la expresión de la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido in vitro, en una célula o in vivo.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico del tercer aspecto. En una realización, el vector es un vector viral.

En un quinto aspecto, la invención proporciona una célula transformada o huésped que expresa el péptido quimérico del primer aspecto.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un péptido quimérico tal como se define en el primer aspecto para su uso en un método de mejora del metabolismo de la glucosa en un sujeto que lo necesite. En una realización, el sujeto tiene una condición hiperglucémica, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico, obesidad, masa corporal indeseable, enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD) esteatohepatitis no alcohólica (NASH), o aterosclerosis. En una realización adicional, la condición hiperglucémica comprende la diabetes. En una realización adicional, la diabetes es una diabetes dependiente de la insulina (tipo I), diabetes tipo II, diabetes gestacional o prediabetes. En otra realización, el sujeto: (i) tiene un nivel de glucosa plasmática en ayunas (FPG) superior a 100 mg/dl; (ii) tiene un nivel de FPG superior a 125 mg/dl; (iii) tiene un nivel de FPG de entre 100 y 125 mg/dl; o (iv) tiene un nivel de hemoglobina A1c (HbA1c) superior al 6%.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un péptido quimérico tal como se define en el primer aspecto para su uso en un método de tratamiento de un trastorno, en el que el trastorno es una condición hiperglucémica, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico, obesidad, masa corporal indeseable, enfermedad del hígado grasa no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o aterosclerosis. En una realización, la condición hiperglucémica comprende la diabetes. En una realización adicional, la diabetes es la diabetes dependiente de la insulina (tipo I), diabetes tipo II, diabetes gestacional o prediabetes.

En una realización del sexto o séptimo aspecto, el método resulta en una mayor sensibilidad a la insulina, reducción de la resistencia a la insulina, reducción del glucagón, tolerancia mejorada a la glucosa, mejora del metabolismo de la glucosa u homeostasis, mejora de la función pancreática, reducción del nivel de triglicéridos, reducción del nivel de colesterol, reducción del nivel de LDL, reducción del nivel de VLDL, presión arterial reducida, reducción del engrosamiento intimal de los vasos sanguíneos, reducción de la masa corporal o aumento de peso, o disminución de los niveles de glucosa; en el que, opcionalmente, el nivel de glucosa se reduce en al menos un 5%.

En otra realización de los aspectos sexto o séptimo, el método comprende además la administración de una terapia suplementaria. En una realización adicional, dicha terapia suplementaria se administra antes, al mismo tiempo o después de la administración del péptido quimérico. En una realización adicional, la terapia suplementaria comprende: (a) una cirugía de pérdida de peso, bypass gástrico, gastrectomía, balón gástrico o manga gástrica; o (b) un agente reductor de glucosa, insulina, análogo GLP1, biguanida, sulfonilurea, tiazolidindionas, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), una formulación de bromocriptina, un secuestrante del ácido biliar, metformina, tiazolidindionas (TZD), un inhibidor de SGLT-2, o cualquier combinación de los mismos. En una realización adicional: (i) dicha biguanida o sulfonilurea es tolbutamida, clorpropamida, acetohexamida, tolazamida, glibenclamida, glipizida o cualquier combinación de los mismos; (ii) dichas tiazolidindionas son rosiglitazona o pioglitazona, o una combinación de los mismos; (iii) dicho secuestrante del ácido biliar es el colesevelum; o (iv) dicha insulina es insulina en bolo, insulina basal o un análogo de la misma.

En el contexto de la invención, las referencias a métodos de tratamiento, prevención o similares deben entenderse como referencias a los compuestos y composiciones de la invención, como los péptidos quiméricos, ácidos nucleicos, vectores o células, para su uso en dichos métodos. Por consiguiente, los aspectos y las realizaciones relativas a los métodos deben entenderse como los relativos a un compuesto o composición para su uso en el sentido anterior.

La invención se basa, en parte, en variantes de secuencias peptídicas del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19), fusiones del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19) y/o secuencias peptídicas del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) y variantes de fusiones (quimeras) de secuencias peptídicas del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19) y/o del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) que tienen una o más actividades, como la actividad de reducción de glucosa. Tales variantes y fusiones (quimeras) de FGF19 y/o secuencias peptídicas FGF21 incluyen secuencias que no aumentan o inducen la formación de carcinomas hepatocelulares (HCC) o la tumorigenesis de HCC. Tales variantes y fusiones (quimeras) de las secuencias peptídicas FGF19 y/o FGF21 también incluyen secuencias que no inducen una elevación sustancial o aumento en el perfil lipídico.

En un caso, una secuencia de péptidos quiméricos incluye o consiste en: una región N-terminal que tiene al menos siete residuos de aminoácidos, la región N-terminal tiene una primera posición de aminoácido y una última posición de aminoácidos, donde la región N-terminal tiene un DSSPL o secuencia DASPH; y una región C-terminal que tiene una porción de FGF19, donde la región C-terminal tiene una primera posición de aminoácidos y una última posición de aminoácidos, donde la región C-terminal incluye los residuos de aminoácidos 16-29 de FGF19 (WGDPIRLRHLYTSG), y donde el residuo W corresponde a la primera posición de aminoácidos de la región C-terminal.

En otro caso, una secuencia de péptidos quiméricos incluye o consiste en: una región N-terminal que tiene una porción de FGF21, donde la región N-terminal tiene una primera posición de aminoácido y una última posición de aminoácido, donde la región N-terminal tiene una secuencia GQV, y donde el residuo V corresponde a la última

posición de aminoácidos de la región N-terminal; y una región C-terminal que incluye una porción de FGF19, teniendo la región C-terminal una primera posición de aminoácidos y una última posición de aminoácidos, donde la región C-terminal incluye los residuos de aminoácidos 21-29 de FGF19 (RLRHLYTSG), y donde el residuo R corresponde a la primera posición de la región C-terminal.

- 5 En otro caso, una secuencia de péptidos quiméricos incluye o consiste en cualquiera de: una región N-terminal que comprende una porción de SEQ ID NO:100 [FGF21], la región N-terminal que tiene una primera posición de aminoácidos y una última posición de aminoácidos, en la que la región N-terminal comprende al menos 5 (o más) aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:100 [FGF21], incluidos los residuos de aminoácidos GQV, y en el que el residuo V corresponde a la última posición de aminoácidos de la región N-terminal; y una región C-terminal que
10 comprende una porción de SEQ ID NO:99 [FGF19], teniendo la región C-terminal una primera posición de aminoácidos y una última posición de aminoácidos, en la que la región C-terminal comprende los residuos de aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO:99 [FGF19], RLRHLYTSG, y en el que el residuo R corresponde a la primera posición de la región C-terminal. En casos particulares, la región N-terminal comprende al menos 6 aminoácidos contiguos (o más, p. ej., 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-75, 75-100 aminoácidos contiguos) de los aminoácidos SEQ ID NO:100 [FGF21] incluyendo los residuos de aminoácidos GQV.
15

- En un caso adicional, una secuencia de péptidos incluye o consiste en cualquiera de: una variante de la secuencia del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones o eliminaciones en comparación con una referencia o FGF19 natural; una variante de la secuencia del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) con una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones o deleciones en
20 comparación con un FGF21 de referencia o natural; una parte de una secuencia FGF19 fusionada a una parte de una secuencia FGF21; o una parte de una secuencia FGF19 fusionada a una porción de una secuencia FGF21, en la que las porciones de secuencia FGF19 y/o FGF21 tienen una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones o eliminaciones en comparación con una FGF19 y/o FGF21 de referencia o natural.

- En otros casos más, una secuencia peptídica o una secuencia peptídica quimérica incluye o consiste en los aminoácidos aminoterminales 1-16 de SEQ ID NO:100 [FGF21] fusionados a los aminoácidos carboxi-terminal 21-194 de SEQ ID NO:99 [FGF19], o la secuencia peptídica tiene los aminoácidos amino-terminal 1-147 de SEQ ID NO:99 [FGF19] fusionados a los aminoácidos carboxi-terminal 147-181 de SEQ ID NO:100 [FGF21] (M41), o la secuencia peptídica tiene los aminoácidos amino-terminal 1-20 de SEQ ID NO:99 [FGF19] fusionados a los aminoácidos carboxi-terminal 17-181 de SEQ ID NO:100 [FGF21] (M44), o la secuencia peptídica tiene aminoácidos aminoterminales 1-146 de SEQ ID NO:100 [FGF21] fusionados a los aminoácidos carboxi-terminal 148-194 de SEQ ID NO:99 [FGF19] (M45), o la secuencia peptídica tiene los aminoácidos-terminales 1-20 de SEQ ID NO:99 [FGF19] fusionados a los aminoácidos internos 17-146 de SEQ ID NO:100 [FGF21] fusionados a los aminoácidos carboxi-terminal 148-194 de SEQ ID NO:99 [FGF19] (M46).
30

- En otros casos adicionales, una secuencia peptídica o una secuencia peptídica quimérica tiene un motivo de secuencia WGDPI correspondiente a la secuencia WGDPI de los aminoácidos 16-20 de SEQ ID NO:99 [FGF19], o tiene un motivo de secuencia WGDPI sustituido, mutado o ausente correspondiente a la secuencia FGF19 WGDPI de los aminoácidos 16-20 de FGF19, o el motivo de secuencia WGDPI tiene uno o más aminoácidos sustituidos, mutados o ausentes; o es diferente de una secuencia de la variante FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDV, WGD, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAl, WGDPA, WDPI, WGD, WGDPI o FGDPI sustituido por la secuencia FGF19 WGDPI en los aminoácidos 16-20.
40

- En otros casos más, una secuencia peptídica o una secuencia peptídica quimérica tiene una región N-terminal que incluye o consiste en los residuos de aminoácidos VHYG, donde la región N-terminal comprende los residuos de aminoácidos DASPHVHYG, o donde la región N-terminal comprende los residuos de aminoácidos DSSPLVHYG, o donde la región N-terminal comprende los residuos de aminoácidos DSSPLLQ, o donde la región N-terminal comprende los residuos de aminoácidos DSSPLLQFGGQV. En casos particulares, la G corresponde a la última posición de la región N-terminal, o el residuo Q es la última posición de aminoácidos de la región N-terminal, o el residuo V corresponde a la última posición de la región N-terminal.
45

- En otros casos todavía más, una secuencia peptídica o una secuencia peptídica quimérica tiene una región N-terminal que incluye o consiste en RHPIIP, donde R es la primera posición de aminoácidos de la región N-terminal; o HPIIP (por ejemplo, donde HPIIP son los primeros 4 residuos de aminoácidos de la región N-terminal), donde H es la primera posición de aminoácidos de la región N-terminal; o RPLAF, donde R es la primera posición de aminoácidos de la región N-terminal; o PLAF, donde P es la primera posición de aminoácidos de la región N-terminal; o R, donde R es la primera posición de aminoácidos de la región N-terminal, o tiene en la región N-terminal cualquiera de las siguientes secuencias: MDSSPL, MSDSSPL, SDSSPL, MSSPL o SSPL.
50

- En otros casos, una secuencia peptídica o una secuencia peptídica quimérica tiene, en la primera posición de la región N-terminal, un residuo "M", un residuo "R", un residuo "S", un residuo "H", un residuo "P", un residuo "L" o un residuo "D". En casos alternativos, una secuencia peptídica o una secuencia peptídica quimérica no tiene ningún residuo "M" o ningún residuo "R" en la primera posición de aminoácidos de la región N-terminal.
55

En otros casos, una secuencia peptídica o una secuencia peptídica quimérica tiene en la primera y segunda posición de la región N-terminal una secuencia de RM, o en la primera y segunda posición de la región N-terminal una secuencia RM, o en la primera y segunda posición de la región N-terminal una secuencia RD, o en la primera y segunda posición de la región N-terminal una secuencia DS, o en la primera y segunda posición de la región N-terminal una secuencia MD, o en la primera y segunda posición de la región N-terminal una secuencia MS, o en la primera a tercera posición de la región N-terminal una secuencia MDS, o en la primera a tercera posición de la región N-terminal una secuencia RDS, o en la primera a tercera posición de la región N-terminal una secuencia MSD, o en la primera a tercera posición de la región N-terminal una secuencia MSS, o en la primera a tercera posición de la región N-terminal una secuencia DSS, o en la primera a cuarta posición de la región N-terminal una secuencia RDSS, o en la primera a cuarta posición de la región N-terminal una secuencia MDSS, o en la primera a la quinta posición de la región N-terminal una secuencia MRDSS, o en la primera a la quinta posición de la región N-terminal una secuencia MSSPL, o en la primera a la sexta posición de la región N-terminal una secuencia MDSSPL, o en la primera a la séptima posición de la región N-terminal una secuencia MSDSSPL.

En otros casos más, una secuencia peptídica o una secuencia peptídica quimérica una adición de residuos de aminoácidos 30-194 de SEQ ID NO:99 [FGF19] en el extremo C-terminal da como resultado un polipéptido quimérico que tiene en la última posición de la región C-terminal que corresponde a aproximadamente el residuo 194 de SEQ ID NO:99 [FGF19]. En otros casos más, una secuencia peptídica quimérica o una secuencia peptídica comprende la totalidad o una parte de una secuencia FGF19 (por ejemplo, SEQ ID NO:99), colocada en el extremo del término C del péptido, o donde el residuo del terminal amino "R" se elimina del péptido.

En casos más particulares, una secuencia peptídica quimérica o secuencia peptídica incluye o consiste en cualquiera de las secuencias peptídicas de la variante M1-M98, o una subsecuencia o fragmento de cualquiera de las secuencias peptídicas de la variante M1-M98.

En otros casos particulares, una secuencia peptídica quimérica o una secuencia peptídica tiene una región N-terminal o C-terminal de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 residuos de aminoácidos de longitud. En otros casos, una secuencia peptídica quimérica o una secuencia peptídica tiene al menos una eliminación de aminoácidos. En otros casos particulares, una secuencia peptídica quimérica o una secuencia peptídica, o una subsecuencia o fragmento de la misma, tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más deleciones de aminoácidos del extremo aminoácido, el extremo carboxi o internamente. En un caso no limitador particular, la sustitución de aminoácidos, o la eliminación se encuentra en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 8-20 de FGF19 (AGPHVHYGWGDPI).

En casos más particulares, una secuencia peptídica quimérica o secuencia peptídica incluye o consiste en una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100 o más aminoácidos. En casos más particulares, una secuencia peptídica quimérica o secuencia peptídica incluye o consiste en una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100 o más aminoácidos de FGF19 o FGF21.

En otros casos particulares, las secuencias peptídicas quiméricas y las secuencias peptídicas tienen funciones o actividades particulares. En un caso, una secuencia peptídica quimérica o una secuencia peptídica mantiene o aumenta una actividad mediada por FGFR4. En otros casos, una secuencia peptídica quimérica o una secuencia peptídica se une al receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4) o activa FGFR4, o no se une de forma detectable al receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4) o activa FGFR4, o se une a FGFR4 con una afinidad menor, comparable o mayor que la afinidad de unión de FGF19 para FGFR4, o activa FGFR4 en un grado o cantidad menor, comparable o mayor que FGF19 activa FGFR4. En otros casos, una secuencia peptídica quimérica o una secuencia peptídica ha reducido la formación de un carcinoma hepatocelular (HCC) en comparación con FGF19, o una secuencia de la variante FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI o FGDPI sustituidos para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19, y/o tiene una mayor actividad de reducción de glucosa en comparación con FGF19, o una secuencia de la variante FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI o FGDPI sustituidos para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19, y/o tiene menos actividad de aumento de lípidos en comparación con FGF19, o una secuencia de la variante FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGDPI, WGDPI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI o FGDPI sustituidos para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19, y/o tiene menos triglicéridos, colesterol, actividad de aumento de no HDL o HDL en comparación con FGF19, o una secuencia de la variante FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI o FGDPI sustituido para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19, y/o tiene menos actividad de reducción de masa magra en comparación con FGF21. Tales funciones y actividades se pueden determinar in vitro o in vivo, por ejemplo, en un ratón db/db.

En otras realizaciones adicionales, las secuencias peptídicas quiméricas de la invención se pueden incluir en las composiciones. En una realización, una secuencia de péptido quimérico de la invención se incluye en una composición farmacéutica. Tales composiciones incluyen combinaciones de ingredientes inactivos u otros

ingredientes activos. En una realización, una composición, tal como una composición farmacéutica, incluye la secuencia peptídica quimérica de la invención y un agente reductor de glucosa.

En otras realizaciones, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican la secuencia peptídica quimérica de la invención. Estas moléculas pueden incluir además un elemento de control de la expresión en el enlace operable que confiere la expresión de la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido in vitro, en una célula o in vivo, o un vector que comprende la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un vector viral). También se proporcionan células transformadas y huésped que expresan las secuencias peptídicas quiméricas y secuencias peptídicas.

También se proporcionan usos y métodos de tratamiento que incluyen la administración o suministro de cualquier secuencia peptídica quimérica de la invención. En realizaciones particulares, el uso o método de tratamiento de un sujeto incluye administrar un péptido quimérico de la invención a un sujeto, tal que el sujeto tenga, o esté en riesgo de tener, una enfermedad o trastorno tratable por una secuencia peptídica de la invención, en una cantidad eficaz para el tratamiento de la enfermedad o trastorno. En una realización adicional, el método incluye administrar un péptido quimérico de invención a un sujeto, tal como un sujeto que tiene una afección hiperglucémica (por ejemplo, diabetes, tal como una diabetes dependiente de insulina (tipo I), diabetes tipo II o diabetes gestacional), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa o síndrome metabólico, o es obesa o tiene una masa corporal indeseable.

En realizaciones particulares de los métodos y usos, una secuencia peptídica quimérica de la invención se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para mejorar el metabolismo de la glucosa en el sujeto. En realizaciones más particulares, el sujeto tiene un nivel de glucosa plasmática en ayunas superior a 100 mg/dl o tiene un nivel de hemoglobina A1c (HbA1c) superior al 6%, antes de la administración.

En otras realizaciones, se pretende o se consigue un uso o método de tratamiento de un sujeto destinado a reducir los niveles de glucosa, aumento de la sensibilidad frente a la insulina, reducción de la resistencia a la insulina, reducción del glucagón, mejora de la tolerancia a la glucosa o metabolismo de la glucosa u homeostasis, mejora de la función pancreática, o reducción de los niveles de triglicéridos, colesterol, IDL, LDL o VLDL, o una disminución de la presión arterial, una disminución en el engrosamiento intimal de los vasos sanguíneos, o una disminución de la masa corporal o aumento de peso.

También se describen métodos de análisis y/o identificación de una secuencia peptídica quimérica o secuencias peptídicas, tales como secuencias peptídicas quiméricas y secuencias peptídicas que tienen actividad de reducción de glucosa sin producir sustanciales carcinomas hepatocelulares (HCC). En un caso, un método incluye: a) proporcionar una secuencia del péptido quimérico candidato o una secuencia peptídica; b) administrar la secuencia peptídica candidato a un animal de prueba (por ejemplo, un ratón db/db); c) medir los niveles de glucosa del animal después de la administración de la secuencia peptídica candidata para determinar si la secuencia peptídica candidata reduce los niveles de glucosa. En un caso particular, también se analiza la secuencia peptídica quimérica o la secuencia peptídica para la inducción de HCC en el animal (por ejemplo, la evaluación de una muestra de tejido hepático del animal de ensayo), o la expresión de un marcador que se correlaciona con la actividad del HCC, en el que un péptido candidato tiene actividad de reducción de glucosa y actividad de HCC no sustancial. Estos métodos identifican al candidato como que tiene actividad de reducción de glucosa, opcionalmente también sin actividad sustancial del carcinoma hepatocelular (HCC).

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra las secuencias de proteínas FGF19 y FGF21, y las secuencias de variantes representativas, a saber, las secuencias de la variante M5, la variante M1, la variante M2, la variante M69, la variante M3, la variante M48, la variante M49, la variante M50, la variante M51, la variante M52, la variante M53 y la variante M70. También se muestran 3 formas alélicas adicionales (polimórficas) de FGF21, a saber, M71, M72 y M73.

La Fig. 2 muestra los intercambios de dominio representativos entre las secuencias de proteínas FGF21 (sin sombreado) y FGF19 (sombreado gris) y las secuencias de fusión (quimérica) resultantes. Las regiones de aminoácidos de cada una de FGF21 y FGF19 presentes en la fusión (quimera) están indicadas por los números. La reducción de glucosa y la elevación de los lípidos se muestran para cada una de las secuencias quiméricas.

Las Fig. 3A-3I muestran datos de reducción de glucosa y peso corporal. A) variante M5; B) variante M1; C) variante M2 y variante M69; D) variante M3; E) variante M48 y variante M49; F) variante M51 y variante M50; G) péptido variante M52; H) péptido variante M53; y I) secuencias peptídicas de la variante M70 todas tienen una reducción de la actividad de glucosa (es decir, son antidiabéticas) en ratones db/db. Los ratones fueron inyectados con el vector AAV que expresa FGF19, FGF21, las variantes seleccionadas, y solución salina y GFP son controles negativos.

Las Fig. 4A-4I muestran el perfil lipídico sérico (triglicéridos, colesterol total, HDL y no HDL) de ratones db/db inyectados con el vector AAV que expresa FGF19, FGF21 o A) variante M5; B) variante M1; C) variante M2 y variante M69; D) variante M3; E) variante M48 y variante M49; F) variante M51 y variante M50; G) péptido variante M52; H) péptido variante M53; y I) secuencias peptídicas de la variante M70. La secuencia peptídica de la variante

M5 no aumentó ni elevó los lípidos, a diferencia de FGF19, M1, M2 y M69, que aumentan y elevan los lípidos. Los niveles séricos de todas las variantes fueron comparables. Solución salina y GFP son controles negativos.

Las Fig. 5A-5I muestran datos relacionados con un carcinoma hepatocelular (HCC) para A) variante M5; B) variante M1; C) variante M2 y variante M69; D) variante M3; E) variante M48 y variante M49; F) variante M51 y variante M50; G) variante M52; H) péptido variante M53; y I) secuencias peptídicas de la variante M70. Ninguna de las variantes aumentó significativamente o indujo la formación de carcinoma hepatocelular (HCC) o tumorigenesis de HCC, a diferencia de FGF19. La puntuación de HCC se registra como el número de nódulos HCC en la superficie de todo el hígado de ratones inyectados por variantes dividido por el número de nódulos HCC de ratones de natural inyectados con FGF19.

Las Fig. 6A-6I muestran datos de masa magra o masa grasa para A) variante M5; B) variante M1; C) variante M2 y variante M69; D) variante M3; E) variante M48 y variante M49; F) variante M51 y variante M50; G) variante M52; H) péptido variante M53; y I) secuencias peptídicas de variante M70. A excepción de M2, M5 y M69, las secuencias peptídicas de las variantes reducen la masa magra o la masa grasa, a diferencia de FGF21.

Las Fig. 7A-7B muestran datos gráficos que demuestran que la inyección de los polipéptidos de A) la variante M5 recombinante; y B) la variante M69 reducen la glucosa en sangre en ratones ob/ob.

La Fig. 8 muestra datos que indican que la expresión hepática de la familia aldo-ceto reductasa 1, miembro C18 (Akr1C18) y la familia portadora de soluto 1, miembro 2 (slc1a2) parece correlacionarse con la actividad del HCC.

Descripción detallada

La invención proporciona secuencias químéricas y peptídicas que son capaces de reducir o bajar los niveles de glucosa. En un caso, una secuencia peptídica químérica incluye o consiste en una región N-terminal que tiene al menos siete residuos de aminoácidos y la región N-terminal tiene una primera posición de aminoácido y una última posición de aminoácidos, donde la región N-terminal tiene una secuencia DSSPL o DASPH; y una región C-terminal que tiene una porción de FGF19 y la región C-terminal que tiene una primera posición de aminoácidos y una última posición de aminoácidos, donde la región C-terminal incluye los residuos de aminoácidos 16-29 de FGF19 (WGDPIRLRHLYTSG) y el residuo W corresponde a la primera posición de aminoácidos de la región C-terminal.

En otro caso, una secuencia peptídica químérica incluye o consiste en una región N-terminal que tiene una porción de FGF21 y la región N-terminal que tiene una primera posición de aminoácido y una última posición de aminoácidos, donde la región N-terminal tiene una secuencia GQV y el residuo V corresponde a la última posición de aminoácidos de la región N-terminal; y una región C-terminal que tiene una porción de FGF19 y la región C-terminal que tiene una primera posición de aminoácidos y una última posición de aminoácidos donde la región C-terminal incluye los residuos de aminoácidos 21-29 de FGF19 (RLRHLYTSG) y el residuo R corresponde a la primera posición de la región C-terminal.

En otros casos, una secuencia peptídica incluye o consiste en una variante de la secuencia del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19) con una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones o eliminaciones en comparación con una FGF19 de referencia o natural. En otros casos, una secuencia peptídica incluye o consiste en una variante de la secuencia del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) que tiene una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones o eliminaciones en comparación con una FGF21 referencia o natural. En otros casos más, una secuencia peptídica incluye o consta de una parte de una secuencia FGF19 fusionada a una parte de una secuencia FGF21. En otros casos más, una secuencia peptídica incluye o consiste en una parte de una secuencia FGF19 fusionada a una parte de una secuencia FGF21, donde las porciones de las secuencia FGF19 y/o FGF21 tienen una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones o eliminaciones de aminoácidos en comparación con una FGF19 y/o FGF21 de referencia o natural.

También se describen en este documento métodos y usos de tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno metabólico tratable utilizando variantes y fusiones de secuencias peptídicas del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19) y del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21). En un caso, un método incluye poner en contacto o administrar a un sujeto una o más factor secuencias peptídicas del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19) y/o del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) en una cantidad eficaz para el tratamiento del trastorno. En otro caso, un método incluye poner en contacto o administrar a un sujeto una o más moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia peptídica del factor de crecimiento de fibroblastos de fusión o variante 19 (FGF19) y/o factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) (por ejemplo, un elemento de control de la expresión en unión operativa con el ácido nucleico que codifica la secuencia peptídica, incluyendo opcionalmente un vector), en una cantidad eficaz para el tratamiento del trastorno.

Aunque no es necesaria una comprensión del mecanismo subyacente de acción de los péptidos de la invención para poner en práctica la invención, sin vincularse a ninguna teoría o hipótesis en particular, se cree que los péptidos de la invención imitan, al menos en parte, el efecto que la cirugía bariátrica tiene, por ejemplo, en la homeostasis de glucosa y la pérdida de peso. Los cambios en la secreción de hormonas gastrointestinales (por ejemplo, el péptido tipo glucagón 1 (GLP-1)) después de la cirugía bariátrica se consideran responsables de la resolución de, por ejemplo, condiciones diabéticas. FGF19 está muy expresado en el intestino delgado distal, y la sobreexpresión

transgénica de FGF19 mejora la homeostasis de la glucosa. Debido a que los niveles de FGF19 en los seres humanos también son elevados después de la cirugía del bypass gástrico, el FGF19 elevado podría estar involucrado con la remisión de la diabetes observada después de la cirugía bariátrica.

Una secuencia de referencia representativa o natural de FGF19 se establece como:

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEI
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHR
LPVSLSSAKQRQLYKNRGLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPF
GLVTGLEAVRSPSF EK (SEQ ID NO:99).

Una secuencia de referencia representativa o natural de FGF21 se establece como:

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP
GVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
NKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

(SEQ ID NO:100) las variantes alélicas de FGF21 se ilustran en la Figura 1 (p. ej. M70, M71 y M72).

Los términos secuencia "peptídica", "proteínica" y "polipeptídica" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a dos o más aminoácidos, o "residuos", que incluyen modificaciones químicas y derivados de aminoácidos, covalentemente unidos por un enlace de amida o equivalente. Los aminoácidos que forman todo o una parte de un péptido pueden pertenecer a los 21 aminoácidos de origen natural conocidos, que se denominan por su abreviatura con una sola letra o la abreviatura común de tres letras. En las secuencias peptídicas de la invención, los residuos de aminoácidos convencionales tienen su significado convencional. Por lo tanto, "Leu" es leucina, "Ile" es isoleucina, "Nle" es norleucina, y así sucesivamente.

En este documento se ejemplifican secuencias peptídicas, distintas de los polipéptidos FGF19 y FGF21 establecidos en el presente documento, que reducen o disminuyen la glucosa, in vivo (Tablas 1-8 y Figura 1). Ejemplos particulares no limitantes son una secuencia peptídica con aminoácidos aminoterminales 1-16 de FGF21 fusionados a los aminoácidos carboxi-terminal 21-194 de FGF19; una secuencia peptídica con aminoácidos aminoterminales 1-147 de FGF19 fusionados a los aminoácidos carboxi-terminal 147-181 de FGF21; una secuencia peptídica con aminoácidos aminoterminales 1-20 de FGF19 fusionados a aminoácidos carboxi-terminal 17-181 de FGF21; una secuencia peptídica con aminoácidos aminoterminales 1-146 de FGF21 fusionados a aminoácidos carboxi-terminal 148-194 de FGF19; y una secuencia peptídica con aminoácidos aminoterminales 1-20 de FGF19 fusionados a aminoácidos internos 17-146 de FGF21 fusionados a los aminoácidos carboxi-terminal 148-194 de FGF19.

Las secuencias peptídicas particulares adicionales tienen un motivo de secuencia WGDPI correspondiente a la secuencia WGDPI de los aminoácidos 16-20 de FGF19, carecen de un motivo de secuencia WGDPI correspondiente a la secuencia WGDPI de los aminoácidos 16-20 de FGF19, o tienen un motivo de la secuencia WGDPI sustituido (es decir, mutado) correspondiente a la secuencia FGF19 WGDPI de los aminoácidos 16-20 de FGF19.

Las secuencias peptídicas particulares que se describen en este documento también incluyen secuencias distintas de las secuencias de las variantes FGF19 y FGF21 (por ejemplo, como se establece en el presente documento), y FGF19 que tienen cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI o FGDPI sustituido por la secuencia FGF19 WGDPI en los aminoácidos 16-20. En consecuencia, los FGF19 y FGF21 naturales (por ejemplo, como se establece en este documento como SEQ ID NOS:99 y 100, respectivamente) pueden ser secuencias excluidas, y también se puede excluir FGF19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI o FGDPI sustituidos para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19. Esta exclusión, sin embargo, no se aplica a cuando una secuencia tiene, por ejemplo, 3 residuos FGF21 fusionados con FGF19 que tienen, por ejemplo, cualquiera de GQV, GQV, GDI o GPI, o 2 residuos FGF21 fusionados a cualquiera de WGPI, WGDI, GDPI, WDPI, WGDI o WGDPI.

Los ejemplos particulares no limitantes de secuencias peptídicas incluyen o consisten en la totalidad o una parte de una variante de secuencia especificada en este documento como M1-M98 (SEQ ID NOS: 1-98). Ejemplos más particulares no limitantes de secuencias peptídicas incluyen o consisten en la totalidad o una parte de una secuencia establecida como:

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVAL
RTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGL
EAVRSPSFEK

(las secuencias FGF21 también pueden incluir un residuo "R" en el extremo amino), o una subsecuencia o fragmento del mismo; o

DSSPLLQFGGQVRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIK AVALRTV
AIKGVH SVRYLCMGADGKM QGLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAK
QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAV

RSPSF EK, o su subsecuencia o fragmento; o

RPLAFSDASPHVHYG WGDPIRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEI
KAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKM QGLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRL
LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPF

GLVTGLEAVRSPSF EK, o su subsecuencia o fragmento; o

RPLAFSDSSPLVHYG WGDPIRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIK
AVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKM QGLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRL
PVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG

LVTGLEAVRSPSF EK, o su subsecuencia o fragmento; o

DSSPLVHYG WGDPIRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIK AVALR
TVAIKGVH SVRYLCMGADGKM QGLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG LVTGLE

AVRSPSF EK, o su subsecuencia o fragmento; o

RDSSPLVHYG WGDPIRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIK AVAL
RTVAIKGVH SVRYLCMGADGKM QGLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG LVTGL

EAVRSPSF EK (M69), o su subsecuencia o fragmento; o

RDSSPLLQWGDPIRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIK AVALRT
VAIKGVH SVRYLCMGADGKM QGLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSA
KQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG LVTGLEA

VRSPSF EK (M52), o su subsecuencia o fragmento; o

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIK AVAL
RTVAIKGVH SVRYLCMGADGKM QGLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG LVTGL

EAVRSPSF EK (M5), o su subsecuencia o fragmento; o

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT EAHLEIRE DGT VGGAADQSPESLLQLKALKP
GVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHSLPLHLPG
NKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPALPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

(M71), co su subsecuencia o fragmento; o

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP
GVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
NKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

(M72), o su subsecuencia o fragmento; o

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP
GVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
NKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVVQDELQGVGGEG
CHMHPENCKTLLTDIDRTHTEKPVWDGITGE (M73), o su subsecuencia o fragmento;

o

RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHR
LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPF
GLVTGLEAVRSPSFEEK (M1), o su subsecuencia o fragmento; o

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIK
AVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRL
PVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFG
LVTGLEAVRSPSFEEK (M2), o su subsecuencia o fragmento; o

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEILEDGYNVYRSEKHR
LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPF
GLVTGLEAVRSPSFEEK (M3), o su subsecuencia o fragmento; o

RDSSPLLQFGGQVRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRT
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSA
KQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGGLVTGLEA
VRSPSFEEK (M48), o su subsecuencia o fragmento; o

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLP
VSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFG
VTGLEAVRSPSFEEK (M49), o su subsecuencia o fragmento; o

RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA
LRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEILEDGYNVYRSEKHRLPVSL
SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGGLVTG
LEAVRSPSFEEK (M50), o su subsecuencia o fragmento; o

RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA
LRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL

SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M51), o su subsecuencia o fragmento; o

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M53), o su subsecuencia o fragmento; y

MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M70),

o una subsecuencia o fragmento de las mismas, o para cualquiera de las secuencias peptídicas anteriores, el residuo del terminal R puede ser eliminado.

- 5 Otros ejemplos particulares no limitantes de las secuencias peptídicas incluyen o consisten en:

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, o su subsecuencia o fragmento; o

DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, o su subsecuencia o fragmento; o

RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, o su subsecuencia o fragmento; o

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, o su subsecuencia o fragmento; o

DSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, o su subsecuencia o fragmento.

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M5); DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M6);

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHL YTSG (M7); HPIPDSSPLLQWGDPIRLRHL YTSG (M8);
 HPIPDSSPLLQFGWGDPIRLRHL YTSG (M9); HPIPDSSPHVHYGWGDPI RLRHL YTSG
 (M10); RPLAFSDAGPLLQWGDPIRLRHL YTSG (M11);
 RPLAFSDAGPLLQFGWGDPIRLRHL YTSG (M12);
 RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHL YTSG (M13); HPIPDSSPHVHYGGQVRLRHL YTSG
 (M14); RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHL YTSG (M15); RPLAFSDAGPHVHWGDPI
 RLRHL YTSG (M16); RPLAFSDAGPHVGWGDPI RLRHL YTSG (M17);
 RPLAFSDAGPHYGWGDPIRLRHL YTSG (M18); RPLAFSDAGPVYGWGDPIRLRHL YTSG
 (M19); RPLAFSDAGPVHGWGDPI RLRHL YTSG (M20);
 RPLAFSDAGPVHYWGDPIRLRHL YTSG (M21);
 RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHL YTSG (M22);
 RPLAFSDAGPHHWGDPIRLRHL YTSG (M23); RPLAFSDAGPHHYWGDPIRLRHL YTSG
 (M24); RPLAFSDAGPHVYWGDPIRLRHL YTSG (M25);
 RPLAFSDSSPLVHWGDPIRLRHL YTSG (M26); RPLAFSDSSPHVHWGDPIRLRHL YTSG
 (M22); RPLAFSDAGPHVWGDPIRLRHL YTSG (M28); RPLAFSDAGPHVHYWGDPI
 RLRHL YTSG (M29); RPLAFSDAGPHVHYAWGDPIRLRHL YTSG (M30);
 RHPIPDSSPLLQFGAQVRLRHL YTSG (M31); RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHL YTSG
 (M32); RHPIPDSSPLLQFGPQVRLRHL YTSG (M33);
 RHPIPDSSPLLQFGGAVRLRHL YTSG (M34); RHPIPDSSPLLQFGGEVRLRHL YTSG
 (M35); RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHL YTSG (M36);
 RHPIPDSSPLLQFGGQARLRHL YTSG (M37); RHPIPDSSPLLQFGGQI RLRHL YTSG
 (M38); RHPIPDSSPLLQFGGQTRLRHL YTSG (M39);
 RHPIPDSSPLLQFGWGQPVRLRHL YTSG (M40); DAGPHVHYGWGDPIRLRHL YTSG
 (M74); VHYGWGDPIRLRHL YTSG (M75); RLRHL YTSG (M77);
 RHPIPDSSPLLQFGWGDPIRLRHL YTSG; RHPIPDSSPLLQWGDPIRLRHL YTSG;
 RPLAFSDAGPLLQFGWGDPI RLRHL YTSG; RHPIPDSSPHVHYGWGDPIRLRHL YTSG;
 RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHL YTSG; RHPIPDSSPHVHYGGQVRLRHL YTSG;
 RPLAFSDAGPHVHYGGDIRLRHL YTSG; RDSSPLLQFGGQVRLRHL YTSG;
 RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHL YTSG; RHPIPDSSPLLQFGAQVRLRHL YTSG;
 RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHL YTSG; RHPIPDSSPLLQFGPQVRLRHL YTSG;
 RHPIPDSSPLLQFGGAVRLRHL YTSG; RHPIPDSSPLLQFGGEVRLRHL YTSG;
 RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHL YTSG; RHPIPDSSPLLQFGGQARLRHL YTSG;
 RHPIPDSSPLLQFGGQIRLRHL YTSG; RHPIPDSSPLLQFGGQTRLRHL YTSG;
 RHPIPDSSPLLQFGWGQPVRLRHL YTSG; and for any of the foregoing peptide sequences the
 y para cualquiera de las secuencias peptídicas anterior

Las secuencias peptídicas descritas en este documento incluyen además aquellas con una menor inducción o formación, o sin éstas, de carcinoma hepatocelular (HCC) en comparación con FGF19, o una secuencia de variantes FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDV o FGDPI sustituidos para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19. Las secuencias peptídicas descritas en este documento también incluyen aquellas con una mayor actividad de reducción de glucosa en comparación con FGF19, o una secuencia de la variante FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDV o FGDPI sustituidos para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19. Las secuencias peptídicas que se describen en este documento, además, incluyen aquellas con menos actividad creciente de lípidos (por ejemplo, triglicéridos, colesterol, no HDL o HDL) en comparación con FGF19, o una secuencia de la variante FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDV o FGDPI sustituidos para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19.

Típicamente, el número de aminoácidos o residuos en una secuencia peptídica de la invención comportará menos de aproximadamente 250 (por ejemplo, aminoácidos o sus miméticos). En varios casos particulares, el número de residuos comprende desde unos 20 hasta unos 200 residuos (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos). En otros casos, el número de residuos comprende entre 50 y unos 200 residuos (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos). En otros casos, el número de residuos comprende entre 100 y unos 195 residuos (por ejemplo, aminoácidos o miméticos de los mismos) en su longitud.

Los aminoácidos o residuos pueden estar unidos por amida o por enlaces químicos no naturales y de no amida, incluidos, por ejemplo, los formados con glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales o N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Los enlaces no amida incluyen, por ejemplo, cetometileno, aminometileno, olefina, éter, tioéter y similares (véase, por ejemplo, Spatola en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357 (1983), "Peptide and Backbone Modifications", Marcel Decker, NY). Por lo tanto, cuando un péptido incluye una porción de una secuencia FGF19 y una porción de una secuencia FG21, las dos porciones no tienen que unirse entre sí por un enlace de amida, sino que pueden unirse mediante cualquier otro resto químico o conjugándose entre sí a través de un resto del enlazante.

Se describen además en el presente documento subsecuencias, variantes y formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificadas (incluidas las variantes FGF19 y FGF21 y subsecuencias enumeradas en las Tablas 1-8 y Figura 1, y las fusiones FGF19/FGF21 y quimeras enumeradas en las Tablas 1-8 y la Figura 1), siempre y cuando lo anterior conserve al menos una actividad o función detectable o medible. Por ejemplo, ciertos péptidos de variantes ejemplificadas tienen la secuencia C-terminal de FGF19,

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEIKAVLRITVAIKGVHVSRYLCMGADGKM
QGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGLPLSHFLPML
PMVPEEPEDLRGHLESMDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK

en la porción C-terminal, por ejemplo, después de los residuos de aminoácidos "TSG" de la variante.

Además, ciertos péptidos variantes ejemplificados, por ejemplo, aquellos que tienen la totalidad o una parte de la secuencia FGF21 en el extremo amino, tienen un residuo "R" colocado en el extremo N-terminal, que puede ser omitido. Del mismo modo, algunos péptidos de variantes ejemplares, incluyen un residuo "M" colocado en el extremo N-terminal, que puede ser anexado o sustituido por un residuo omitido, tal como un residuo "R". Más particularmente, en varios casos las secuencias peptídicas en el extremo N-terminal incluyen cualquiera de: RDSS, DSS, MDSS o MRDSS. Además, en las células, cuando un residuo "M" es adyacente a un residuo "S", el residuo "M" puede ser separado de modo que el residuo "M" se suprima de la secuencia peptídica, mientras que cuando el residuo "M" es adyacente a un residuo "M", el residuo "M" no puede ser separado. Así, a modo de ejemplo, en varios casos las secuencias peptídicas incluyen aquellas con los siguientes residuos en el extremo N-terminal: MDSSPL, MSDSSPL (separado de SDSSPL) y MSSPL (separado de SSPL).

En consecuencia, las secuencias "peptídicas", "polipeptídicas" y "proteínicas" que se describen en el presente documento incluyen subsecuencias, variantes y formas modificadas de las variantes FGF19 y FGF21 y subsecuencias enumeradas en las Tablas 1-8 y Figura 1, y las fusiones FGF19/FGF21 y quimeras enumeradas en los Tablas 1-8 y Figura 1, siempre que la subsecuencia, variante o forma modificada (por ejemplo, fusión o quimera) conserve al menos una actividad o función detectable.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "modificar" y sus variaciones gramaticales, significa que la composición se desvía en relación con una composición de referencia, tal como con una secuencia peptídica. Tales secuencias peptídicas modificadas, ácidos nucleicos y otras composiciones pueden tener una mayor o menor actividad o función, o tener una función o actividad distinta en comparación con una secuencia peptídica no modificada de referencia, ácido nucleico u otra composición, o puede tener una propiedad deseable en una proteína formulada para el tratamiento (por ejemplo, vida media sérica), para obtener anticuerpos para su uso en un ensayo

de detección, y/o para la purificación de proteínas. Por ejemplo, una secuencia peptídica de la invención puede modificarse para aumentar la vida media sérica, para aumentar la estabilidad in vitro y/o in vivo de la proteína, etc.

Ejemplos particulares de tales subsecuencias, variantes y formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificadas en este documento (por ejemplo, una secuencia peptídica enumerada en las Tablas 1-8 y Figura 1) incluyen sustituciones, eliminaciones y/o inserciones/adiciones de uno o más aminoácidos ácidos, hacia o desde el extremo amino-terminal, el carboxi-terminal o internamente. Un ejemplo es la sustitución de un residuo de aminoácidos por otro residuo de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica. Otro es la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia peptídica, o una inserción o adición de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica.

El número de residuos sustituidos, eliminados o insertados/añadidos son uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250, o más) de una secuencia peptídica. Por lo tanto, una secuencia FGF19 o FGF21 puede tener pocos o muchos aminoácidos sustituidos, eliminados o insertados/añadidos (por ejemplo, 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250, o más). Además, una secuencia de aminoácidos FGF19 puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250, o más aminoácidos de FGF21; o un aminoácido o secuencia FGF21 puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250, o más aminoácidos de FGF19.

Ejemplos específicos de sustituciones incluyen la sustitución de un residuo D por un residuo L. En consecuencia, aunque los residuos se enumeran en la configuración del L-isómero se incluyen los aminoácidos D en cualquier posición particular o en todas las posiciones de las secuencias peptídicas de la invención, a menos que un isómero D conduzca a una secuencia que no tenga una función detectable o medible.

Otros ejemplos específicos son sustituciones no conservadoras y conservadoras. Una "sustitución conservadora" es una sustitución de un aminoácido por un residuo biológico, químico o estructuralmente similar. Biológicamente similar significa que la sustitución es compatible con una actividad biológica, por ejemplo, la actividad de reducción de glucosa. Estructuralmente similar significa que los aminoácidos tienen cadenas laterales con longitud similar, como alanina, glicina y serina, o que tienen un tamaño similar, o se mantiene la estructura de una secuencia peptídica primera, segunda o adicional. La similitud química significa que los residuos tienen la misma carga o son hidrófilos e hidrófobos. Ejemplos particulares incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, glutámico por ácidos aspárticos, o glutamina por asparagina, serina por trionina, etc. Los ensayos de rutina se pueden utilizar para determinar si una subsecuencia, variante o forma modificada tiene actividad, por ejemplo, actividad de reducción de glucosa.

Ejemplos particulares de subsecuencias, variantes y formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificadas en el presente documento (por ejemplo, una de las secuencias peptídicas enumeradas en las Tablas 1-8 y Figura 1) tienen 50%-60%, 60%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95%, o 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con respecto a una secuencia peptídica de referencia (por ejemplo, una secuencia peptídica en cualquiera de las Tablas 1-8 y Figura 1). El término "identidad" y "homología" y sus variaciones gramaticales significan que dos o más entidades referenciadas son las mismas. Por lo tanto, cuando dos secuencias de aminoácidos son idénticas, tienen la misma secuencia de aminoácidos. "Áreas, regiones o dominios de identidad" significa que una parte de dos o más entidades a las que se hace referencia son iguales. Por lo tanto, cuando dos secuencias de aminoácidos son idénticas u homólogas en una o más regiones de secuencia, comparten la identidad en estas regiones.

El alcance de la identidad entre dos secuencias se puede determinar utilizando programas informáticos y algoritmos matemáticos conocidos en la técnica. Estos algoritmos que calculan la identidad de secuencia en porcentaje (homología) generalmente representan los huecos de la secuencia y los desapareamientos en la región de comparación. Por ejemplo, un algoritmo de búsqueda BLAST (por ejemplo, BLAST 2.0) (véase, por ejemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990), disponible públicamente a través de NCBI) tiene parámetros de búsqueda ejemplares de la siguiente manera: desapareamiento -2; hueco abierto 5; extensión de hueco 2. Para las comparaciones de secuencias peptídicas, un algoritmo BLASTP se utiliza normalmente en combinación con una matriz de puntuación, como PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 o BLOSUM 50. También se utilizan los programas de comparación de secuencias FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) y SSEARCH para cuantificar el alcance de la identidad (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988); Pearson, Methods Mol Biol. 132:185 (2000); y Smith et al., J. Mol. Biol. 147:195 (1981)). También se han desarrollado programas para cuantificar la similitud estructural de proteínas utilizando mapeos topológicos basados en Delaunay (Bostick et al., Biochem Biophys Res Commun. 304:320 (2003)).

En las secuencias peptídicas descritas en este documento, incluidas las subsecuencias, variantes y formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificadas en el presente documento (por ejemplo, las secuencias enumeradas en las Tablas 1-8 y Figura 1) un "aminoácido" o "residuo" incluye alfa-aminoácidos convencionales, así como beta-aminoácidos, alfa aminoácidos, disustituídos en alfa y aminoácidos N-sustituídos donde al menos una cadena lateral es un resto de cadena lateral de aminoácidos como se define en este documento. Un "aminoácido" incluye además alfa-aminoácidos de N-alquilo, donde el grupo amino N-terminal tiene un sustituyente de alquilo C₁ a C₆ lineal o ramificado. Por lo tanto, el término "aminoácido" incluye estereoisómeros y modificaciones de aminoácidos de proteínas de origen natural, aminoácidos no proteicos, aminoácidos modificados post-traduccionalmente (por ejemplo, por glicosilación, fosforilación, división por éster o amida, etc.), aminoácidos modificados o sintetizados enzimáticamente, aminoácidos derivatizados, construcciones o estructuras diseñadas para imitar aminoácidos, aminoácidos con un resto de cadena lateral modificado, derivados de restos naturales, o sintéticos, o no naturales, etc. Se incluyen aminoácidos modificados e inusuales en las secuencias peptídicas que se describen en este documento (véase, por ejemplo, en *Synthetic Peptides: A User's Guide*; Hruby et al., *Biochem. J.* 268:249 (1990); y Toniolo C., *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:287 (1990)).

Además, se incluyen grupos de protección y modificación de aminoácidos. La expresión "resto de la cadena lateral del aminoácido", tal como se utiliza en este documento, incluye cualquier cadena lateral de cualquier aminoácido, como se define el término "aminoácido" en este documento. Este incluye, por lo tanto, el resto de la cadena lateral en aminoácidos de origen natural. Además, incluye restos de cadena lateral en aminoácidos naturales modificados como se establece en el presente documento y como es conocido por cualquiera de los expertos en la técnica, tales como los restos de cadena lateral en estereoisómeros y las modificaciones de aminoácidos de proteínas naturales, aminoácidos no proteicos, aminoácidos posteriores a la traducción modificados, aminoácidos modificados enzimáticamente o sintetizados, aminoácidos derivatizados, construcciones o estructuras diseñadas para imitar aminoácidos, etc. Por ejemplo, el resto de la cadena lateral de cualquier aminoácido descrito en este documento o conocido por cualquiera de los expertos en la técnica se incluye dentro de la definición.

Los "derivados de un resto de cadena lateral de aminoácidos" se incluyen dentro de la definición de resto de la cadena lateral de aminoácidos. Ejemplos no limitantes de restos de la cadena lateral de aminoácidos derivatizados incluyen, por ejemplo: (a) agregar uno o más átomos de carbono saturados o insaturados a una cadena de alquilo, arilo o alquilo existente; (b) sustituir un carbono en la cadena lateral por otro átomo, preferiblemente oxígeno o nitrógeno; (c) añadir un grupo terminal a un átomo de carbono de la cadena lateral, incluyendo metilo (–CH₃), metoxi (–OCH₃), nitro (–NO₂), hidroxilo (–OH) o ciano (–C≡N); (d) para los restos de la cadena lateral incluyendo un grupo hidroxilo, tiol o amino, añadiendo un grupo de protección hidroxilo, tiol o amino adecuado; o (e) para los restos de la cadena lateral incluyendo una estructura de anillo, añadiendo uno o más sustitutos de anillo, incluyendo grupos hidroxilo, halógenos, alquilo o arilo unidos directamente o a través de un enlace de éter. Para los grupos amino, son conocidos grupos de protección adecuados por los expertos en la técnica. Siempre que dicha derivación proporcione una actividad deseada en la secuencia final del péptido (por ejemplo, disminución de glucosa, metabolismo mejorado de glucosa o lípidos, actividad antidiabética, ausencia de formación sustancial de HCC o tumorigenesis, ausencia de modulación sustancial de la masa magra o grasa, etc.).

Un "resto de la cadena lateral de aminoácidos" incluye toda esta derivación, y los ejemplos particulares no limitantes incluyen: ácido gamma-amino butírico, ácido 12-amino dodecanoico, ácido alfa-aminoisobutírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 4-(aminometil)-ciclohexano carboxílico, ácido 8-amino octanoico, bifenilalanina, Boc-t-butoxicarbonilo, bencilo, benzoilo, citrulina, ácido diaminobutírico, pirrolisina, ácido diaminopropiónico, 3,3-difenilalanina, ortonina, citrulina, ácido 1,3-dihidro-2H-isoindolcarboxílico, etilo, Fmoc-fluorenilmetoxycarbonilo, heptanoilo (CH₃–(CH₂)₅–C(=O)–), hexanoilo (CH₃–(CH₂)₄–C(=O)–), homoarginina, homocisteína, homolisina, homofenilalanina, homoserina, metilo, sulfóxido de metionina, metionina sulfona, norvalina (NVA), fenilglicina, propilo, isopropilo, sarcosina (SAR), terc-butilalanina y benciloxycarbonilo.

En este documento puede denominarse "residuo" a un aminoácido sencillo, incluyendo estereoisómeros y modificaciones de aminoácidos proteicos naturales, aminoácidos no proteicos, aminoácidos modificados de forma post-traduccionales, aminoácidos sintetizados enzimáticamente, aminoácidos no naturales incluyendo aminoácidos derivatizados, un aminoácido alfa, alfa disustituído derivado de cualquiera de los anteriores (es decir, un aminoácido alfa, alfa disustituído, donde, al menos, una cadena lateral es la misma que la del residuo del que se deriva), un beta-aminoácido derivado de cualquiera de los anteriores (es decir, un aminoácido beta, diferente que cuando concurre un carbono beta, es igual que el residuo del que se deriva), etc., incluyéndose todo lo referido anteriormente. Los sustituyentes adecuados, además del resto de la cadena lateral del alfa-aminoácido, incluyen alquilo C₁ a C₆ lineal o ramificado. Aib es un ejemplo de un aminoácido alfa, alfa disustituído. Mientras que los aminoácidos alfa, alfa sustituídos pueden entenderse utilizando las referencias convencionales L y D-isoméricas, debe entenderse que tales referencias se realizan por conveniencia, y que cuando los sustituyentes en la posición alfa son diferentes, tales aminoácidos pueden referirse indistintamente como un aminoácido alfa, alfa disustituído derivado del L- o D-isómero, según corresponda, de un residuo con el resto de la cadena lateral del aminoácido designado. Por lo tanto, puede hacerse referencia al ácido (S)-2-amino-2-metil-hexanoico como un aminoácido alfa, alfa disustituído derivado de L-Nle (norleucina) o como un aminoácido alfa, alfa disustituído derivado de D-Ala. Del mismo modo, puede hacerse referencia al Aib como un aminoácido alfa, alfa disustituído derivado de Ala. Siempre que se proporciona un aminoácido alfa, alfa disustituído, se debe entender como incluyendo todas las configuraciones (R) y (S) de los mismos.

Un "aminoácido N-sustituido" incluye cualquier aminoácido en el que un resto de la cadena lateral del aminoácido se une covalentemente al grupo amino estructural, opcionalmente donde no hay sustitutos distintos de H en la posición alfa-carbono. La sarcosina es un ejemplo de un aminoácido N-sustituido. A modo de ejemplo, la sarcosina puede denominarse un derivado del aminoácido N-sustituido de Ala, en el sentido de que el resto de la cadena lateral del aminoácido de la sarcosina y Ala es la misma, es decir, metilo.

Las modificaciones covalentes de las secuencias peptídicas, incluidas las subsecuencias, variantes y formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificadas en este documento (por ejemplo, secuencias enumeradas en las Tablas 1-8 y Figura 1), son descritas en este documento. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos de aminoácidos dirigidos con un agente derivatizador orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del péptido. La derivación con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para la reticulación del péptido a una matriz de soporte insoluble en agua o superficie para su uso en el método de purificación de anticuerpos antipéptidos, y viceversa. Los agentes de reticulación de uso común incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como de 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes como el metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de los residuos de glutaminilo y asparaginilo respecto a los residuos correspondientes de glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de la amina N-terminal, amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal, etc.

Las secuencias peptídicas ejemplificadas, y las subsecuencias, variantes y formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificadas en este documento (por ejemplo, las secuencias expuestas en los Tablas 1-8 y Figura 1), también pueden incluir alteraciones estructurales respecto a su estabilidad, derivados y peptidomiméticos. El término "peptidomimético" incluye una molécula que es un imitador de un residuo (denominado "mimético"), incluyendo, entre otros, moléculas del núcleo de piperazina, moléculas del núcleo de ceto-piperazina y moléculas del núcleo de diazepina. A menos que se especifique lo contrario, un mimético de aminoácidos de una secuencia peptídica de la invención incluye tanto un grupo carboxilo como un grupo amino, y un grupo correspondiente a una cadena lateral de aminoácidos, o en el caso de un mimético de glicina, ninguna cadena lateral que no sea el hidrógeno.

A modo de ejemplo, estos incluirían compuestos que imiten la distribución estérica, de carga superficial, polaridad, etc. de un aminoácido natural, pero sin que se necesite que sea un aminoácido, lo que impartiría estabilidad en el sistema biológico. Por ejemplo, la prolina puede ser sustituida por otras lactamas o lactonas de tamaño y sustitución adecuados; la leucina puede ser sustituida por una alquil cetona, amida sustituida en N, así como variaciones en la longitud de la cadena lateral de aminoácidos utilizando alquilo, alquenilo u otros sustituyentes, otros pueden ser evidentes para los expertos en la técnica. El elemento esencial para preparar tales sustituciones es proporcionar una molécula de aproximadamente el mismo tamaño y carga y configuración que el residuo utilizado para diseñar la molécula. El refinamiento de estas modificaciones se realizará mediante el análisis de los compuestos en un ensayo funcional (por ejemplo, reducción de glucosa) u otro, y comparando la relación de actividad de la estructura. Estos métodos están dentro del ámbito de los expertos en la técnica que trabajan en química medicinal y desarrollo de fármacos.

Otro tipo de modificación de las secuencias peptídicas de la invención, incluidas las subsecuencias, las variantes de secuencia y las formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificados (incluidos los péptidos expuestos en las Tablas 1-8 y Figura 1), es la glicosilación. Tal como se utiliza en el presente documento, la "glicosilación" se refiere en general a la presencia, adición o unión de una o más restos de azúcar (por ejemplo, carbohidratos) a proteínas, lípidos u otras moléculas orgánicas. El uso del término "desglicosilación" en este documento generalmente está destinado a significar la eliminación o deleción, de uno o más restos de azúcar (por ejemplo, carbohidratos). Además, el término incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas que implican un cambio en el tipo y las proporciones (cantidad) de los diversos restos de azúcar (por ejemplo, carbohidratos) presentes.

La glicosilación se puede lograr mediante la modificación de un resto de aminoácidos, o mediante la adición de uno o más sitios de glicosilación que pueden o no estar presentes en la secuencia nativa. Por ejemplo, un resto típicamente no glicosilado puede sustituirse por un resto que puede ser glicosilado. La adición de sitios de glicosilación se puede lograr mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos. La modificación de la secuencia peptídica puede efectuarse, por ejemplo, mediante la adición o sustitución por uno o más restos de serina o trionina (para sitios de glicosilación unidos a O) o restos de asparagina (para sitios de glicosilación unidos a N). Las estructuras de los oligosacáridos unidos a N y O y los restos de azúcar que se encuentran en cada tipo pueden ser diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra comúnmente en ambos es el ácido N-acetilneurínico (en adelante, como ácido siálico). El ácido siálico es generalmente el resto terminal de los oligosacáridos unidos a N y O y, en virtud de su carga negativa, puede conferir propiedades ácidas a la glicoproteína.

Las secuencias peptídicas descritas en este documento pueden modificarse opcionalmente a través de cambios en el nivel de nucleótido (por ejemplo, ADN), particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el péptido en bases preseleccionadas de modo que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidratos en el péptido es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido (véase, por ejemplo, en el documento WO 87/05330). La desglucosilación se puede lograr eliminando el sitio de glicosilación subyacente, eliminando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos, o mediante la sustitución de codones que codifican restos de aminoácidos que son glucosilados. Se conocen técnicas químicas de desglucosilación, y la escisión enzimática de los restos de carbohidratos en los polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas.

Se pueden utilizar varias líneas celulares para producir proteínas que son glucosiladas. Un ejemplo no limitante son las células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR), que son células huésped comúnmente utilizadas para la producción de glicoproteínas recombinantes. Estas células no expresan la enzima beta-galactosida alfa-2,6-sialiltransferasa y, por lo tanto, no añaden ácido siálico en el enlace alfa-2,6 a oligosacáridos unidos a N de glicoproteínas producidos en estas células.

Otro tipo de modificación es conjugar (por ejemplo, unir) uno o más componentes o moléculas adicionales en el extremo N- y/o C-terminal de una secuencia peptídica de la invención, tal como otra proteína (por ejemplo, una proteína que tenga una secuencia de aminoácidos heteróloga para la proteína diana), o una molécula portadora. Por lo tanto, una secuencia peptídica ejemplar puede ser un conjugado con otro componente o molécula.

En ciertas realizaciones, el extremo amino o carboxi de una secuencia peptídica de invención se puede fusionar con una región Fc de inmunoglobulina (por ejemplo, Fc humana) para formar un conjugado de fusión (o molécula de fusión). Los conjugados de fusión Fc pueden aumentar la vida media sistémica de los agentes biofarmacéuticos, por lo que el producto biofarmacéutico puede tener una actividad prolongada o requerir una administración menos frecuente. Fc se une al receptor Fc neonatal (FcRn) en las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, y, al unirse, la molécula de fusión Fc está protegida de la degradación y se libera de nuevo en la circulación, manteniendo la molécula en circulación durante más tiempo. Esta unión Fc se cree que es el mecanismo por el cual la IgG endógena conserva su larga vida media plasmática. Los medicamentos conocidos y validados de la fusión de Fc consisten en dos copias de un biofarmacéutico unido a la región Fc de un anticuerpo para mejorar la farmacocinética, la solubilidad y la eficiencia de la producción. La tecnología de fusión Fc más reciente une una sola copia de un agente biofarmacéutico a la región Fc de un anticuerpo para optimizar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del agente biofarmacéutico en comparación con los conjugados tradicionales de fusión de Fc.

Una modificación conjugada se puede utilizar para producir una secuencia peptídica que retiene la actividad con una función o actividad adicional o complementaria de la segunda molécula. Por ejemplo, una secuencia peptídica puede conjugarse con una molécula, por ejemplo, para facilitar la solubilidad, el almacenamiento, la vida media in vivo o la vida media en almacenamiento o la estabilidad, la reducción de la inmunogenicidad, la liberación retardada o controlada in vivo, etc. Otras funciones o actividades incluyen un conjugado que reduzca la toxicidad en relación con una secuencia peptídica no conjugada, un conjugado que se dirija a un tipo de célula u órgano de manera más eficiente que una secuencia peptídica no conjugada, o un medicamento para contrarrestar aún más las causas o efectos asociados con un trastorno o enfermedad como se establece en el presente documento (p. ej., la diabetes).

La eficacia clínica de las terapias proteicas puede estar limitada por la vida media plasmática corta y la susceptibilidad a la degradación. Los estudios de diversas proteínas terapéuticas han demostrado que varias modificaciones, incluyendo la conjugación o unión de la secuencia peptídica a cualquiera de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos (véase, por ejemplo, a través de un resto de enlace unido covalentemente tanto a la proteína como al polímero no proteico (por ejemplo, un PEG) puede prolongar la vida media. Estas biomoléculas conjugadas con PEG han demostrado poseer propiedades clínicamente útiles, incluyendo una mejor estabilidad física y térmica, protección contra la susceptibilidad a la degradación enzimática, mayor solubilidad, vida media en circulación in vivo más larga y una disminución del aclaramiento, reducción de la inmunogenicidad y antigenicidad, y disminución de la toxicidad.

Los PEG adecuados para la conjugación a una secuencia peptídica de la invención son generalmente solubles en agua a temperatura ambiente, y tienen la fórmula general $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, donde R es hidrógeno o un grupo protector, tal como un alquilo o un grupo alcohólico, y donde n es un número entero entre 1 y 1000. Cuando R es un grupo protector, generalmente tiene entre 1 y 8 carbonos. El PEG conjugado con la secuencia peptídica puede ser lineal o ramificado. Los derivados de PEG ramificados, los "PEG de estrellas" y los PEG multiarmados se incluyen en la invención. Un peso molecular del PEG utilizado en la invención no se limita a ningún rango en particular, pero ciertas realizaciones tienen un peso molecular entre 500 y 20.000, mientras que otras realizaciones tienen un peso molecular entre 4.000 y 10.000.

La invención incluye composiciones de conjugados en los que los PEG tienen diferentes valores "n" y, por lo tanto, los diferentes PEG están presentes en proporciones específicas. Por ejemplo, algunas composiciones comprenden una mezcla de conjugados donde n = 1, 2, 3 y 4. En algunas composiciones, el porcentaje de conjugados en los que n = 1 es del 18-25%, el porcentaje de conjugados en los que n = 2 es del 50-66%, el porcentaje de conjugados en

los que $n = 3$ es del 12-16%, y el porcentaje de conjugados en los que $n = 4$ es de hasta el 5%. Tales composiciones pueden ser producidas por las condiciones de reacción y los métodos de purificación conocidos en la técnica.

El PEG puede unirse directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un intermedio) a las secuencias peptídicas de la invención. Por ejemplo, en una realización, el PEG se une a través de un grupo reactivo terminal (un "espaciador"). El espaciador, es, por ejemplo, un grupo reactivo terminal que media un enlace entre los grupos libres de aminoácidos o carboxilo de una o más de las secuencias peptídicas y el polietilenglicol. El PEG, que tiene el espaciador que puede unirse al grupo amino libre, incluye N-hidroxisuccinidilimida polietilenglicol, que se puede preparar mediante la activación del éster del ácido succínico de polietilenglicol con N-hidroxisuccinidilimida. Otro polietilenglicol activado que puede estar unido al grupo amino libre es el 2,4-bis(O-metoxipolietilenglicol)-6-cloro-s-triazina, que se puede preparar mediante la reacción de polietilenglicol monometiléter con cloruro cianúrico. El polietilenglicol activado que está unido al grupo libre de carboxilo incluye polioxietilendiamina.

La conjugación de una o más secuencias peptídicas de la invención a PEG, que tiene un espaciador, puede llevarse a cabo por varios métodos convencionales. Por ejemplo, la reacción de conjugación se puede llevar a cabo en solución a un pH entre 5 y 10, una temperatura entre 4°C y temperatura ambiente, durante 30 minutos a 20 horas, utilizando una relación molar de reactivo a proteína entre 4:1 y 30:1. Las condiciones de reacción pueden seleccionarse para dirigir la reacción hacia la producción predominantemente de un grado deseado de sustitución. En general, la baja temperatura, el pH bajo (p. ej., pH=5) y el tiempo de reacción corto tienden a disminuir el número de PEG conectados, mientras que la alta temperatura, el pH de neutro a alto (por ejemplo, pH≥7) y un tiempo de reacción más largo tienden a aumentar el número de PEG conectados. Se pueden utilizar varios métodos conocidos en la técnica para terminar la reacción. En algunas realizaciones, la reacción se termina acidificando la mezcla de reacción y congelando a, por ejemplo, -20°C.

Las secuencias peptídicas de la invención incluyen además la conjugación con macromoléculas grandes y poco a poco metabolizadas, como las proteínas; polisacáridos, como sepharosa, agarosa, celulosa, perlas de celulosa; aminoácidos poliméricos como ácido poliglutámico, polilisina; copolímeros de aminoácidos; partículas de virus inactivadas; toxinas bacterianas inactivadas como el toxoide de la difteria, el tétanos, el cólera, las moléculas de leucotoxina; bacterias inactivadas; y células dendríticas. Tales formas conjugadas, si se desea, se pueden utilizar para producir anticuerpos contra las secuencias peptídicas de la invención.

Otros componentes y moléculas adecuados para la conjugación incluyen, por ejemplo, tiroglobulina; albúminas como la albúmina sérica humana (HSA); toxoide del tétano; toxoide de la difteria; ácidos de poliamino como el poli(D-lisina:D-ácido glutámico); polipéptidos VP6 de rotavirus; virus de la gripe hemaglutinina, nucleoproteína del virus de la gripe; Hemocianina de lapa californiana (KLH); y la proteína y el antígeno superficial del núcleo del virus de la hepatitis B; o cualquier combinación de lo anterior.

La fusión de la albúmina en una secuencia peptídica de invención puede lograrse, por ejemplo, mediante manipulación genética, de modo que la codificación del ADN para la HSA (albúmina sérica humana), o un fragmento de la misma, se une a la codificación de ADN para una secuencia peptídica. A partir de ahí, un huésped adecuado puede transformarse o transfigurarse con la secuencia de nucleótidos fusionados en forma de, por ejemplo, un plásmido adecuado, con el fin de expresar un polipéptido de fusión. La expresión puede realizarse in vitro desde, por ejemplo, células procariotas o eucariotas, o in vivo a partir de, por ejemplo, un organismo transgénico. Se describe en este documento la expresión de la proteína de fusión que se realiza en líneas celulares de mamíferos, por ejemplo, líneas celulares CHO.

Otros medios para fusionar genéticamente proteínas diana o péptidos a la albúmina incluyen una tecnología conocida como Albufuse® (Novozymes Biopharma A/S; Dinamarca), y las secuencias peptídicas terapéuticas conjugadas con frecuencia se vuelven mucho más eficaces con una mejor absorción en el cuerpo. La tecnología se ha utilizado comercialmente para producir Albuferon® (Human Genome Sciences), una combinación de albúmina e interferón α -2B utilizada para tratar la infección por hepatitis C.

Otra realización implica el uso de uno o más anticuerpos de dominio humano (dAb). Los dAbs son las unidades de unión funcionales más pequeñas de los anticuerpos humanos (IgG) y tienen características favorables de estabilidad y solubilidad. La tecnología implica dAb(s) conjugados a HSA (formando así un "AlbudAb"; véanse, por ejemplo, los documentos EP1517921B, WO2005/118642 y WO2006/051288) y una molécula de interés (por ejemplo, una secuencia peptídica de la invención). Los AlbuAbs son a menudo más pequeños y fáciles de fabricar en sistemas de expresión microbiana, como bacterias o levaduras, que las tecnologías actuales utilizadas para extender la vida media sérica de los péptidos. Como un HSA tiene una vida media de aproximadamente tres semanas, la molécula conjugada resultante mejora la vida media. El uso de la tecnología dAb también puede mejorar la eficacia de la molécula de interés.

Otros componentes y moléculas adecuados para la conjugación incluyen aquellos adecuados para el aislamiento o la purificación. Ejemplos particulares no limitantes incluyen moléculas de unión, tales como la biotina (par de unión específico biotina-avidina), un anticuerpo, un receptor, un ligando, una lectina o moléculas que comprendan un soporte sólido, incluyendo, por ejemplo, perlas de plástico o poliestireno, placas o perlas, perlas magnéticas, tiras reactivas y membranas.

Los métodos de purificación, como la cromatografía de intercambio catiónico, se pueden utilizar para separar los conjugados por diferencia de carga, lo que separa eficazmente a los conjugados en sus diversos pesos moleculares. Por ejemplo, la columna de intercambio catiónico se puede cargar y luego lavar con acetato de sodio ~20 mM, pH ~4, y luego eluir con un gradiente lineal de NaCl (de 0M a 0,5M) tamponado a un pH de 3 a 5,5, preferiblemente a pH ~4,5. El contenido de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico puede identificarse por el peso molecular utilizando métodos convencionales, por ejemplo, espectroscopia de masas, SDS-PAGE u otros métodos conocidos para separar entidades moleculares por peso molecular. Se identifica, en consecuencia, una fracción que contiene el conjugado que tiene el número deseado de PEG unidos, purificados, siendo libres de secuencias de proteínas no modificadas y de conjugados con otros números de PEG unidos.

En otras realizaciones, una secuencia peptídica de la invención se une a un agente químico (por ejemplo, una inmunotoxina o un agente quimioterapéutico), incluyendo, entre otros, un agente citotóxico, incluyendo taxol, citocalasina B, gramicidina D, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorrubicina, y análogos u homólogos de los mismos. Otros agentes químicos incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina); agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, carmustina y lomustina, ciclofosfamida, busulfano, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisplatino); antibióticos (p. ej., bleomicina); y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Las citotoxinas se pueden conjugar con un péptido de la invención utilizando la tecnología de enlazantes conocida en la técnica y descrita en este documento.

Otros componentes y moléculas adecuados para la conjugación incluyen los adecuados para la detección en un ensayo. Entre los ejemplos particulares que no limitan se incluyen los marcadores detectables, como los radioisótopos (por ejemplo, ^{125}I ; ^{35}S , ^{32}P ; ^{33}P), una enzima que genera un producto detectable (p. ej., luciferasa, β -galactosidasa, peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina), una proteína fluorescente, una proteína cromogénica, tintes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína); metales que emiten fluorescencia (por ejemplo, ^{152}Eu); compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, sales de luminol y acridinio); compuestos bioluminiscentes (por ejemplo, luciferina); y proteínas fluorescentes. Los marcadores indirectos incluyen anticuerpos marcados o detectables que se unen a una secuencia peptídica, en la que se puede detectar el anticuerpo.

En ciertas realizaciones, una secuencia peptídica de la invención se conjuga con un isótopo radiactivo para generar un radiofármaco citotóxico (radioinmunoconjugados) útil como agente diagnóstico o terapéutico. Ejemplos de tales isótopos radiactivos incluyen, entre otros, yodo 131 , indio 111 , itrio 90 y lutecio 177 . Los métodos para preparar radioinmunoconjugados son conocidos por los expertos en la técnica. Algunos ejemplos de radioinmunoconjugados que están disponibles comercialmente son ibritumomab, tiuxetan y tositumomab.

Otros medios y métodos incluidos en la invención para prolongar la vida media en circulación, aumentar la estabilidad, reducir el aclaramiento o alterar la inmunogenicidad o la alergenidad de una secuencia peptídica de la invención implica la modificación del péptido secuencia por hesilación, que utiliza derivados del almidón de hidroxietilo unidos a otras moléculas con el fin de modificar las características de la molécula. Varios aspectos de la hesilación se describen en, por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. 2007/0134197 y 2006/0258607.

Cualquiera de los componentes y moléculas anteriores utilizados para modificar las secuencias peptídicas de la invención puede conjugarse opcionalmente a través de un enlazante. Los enlazantes adecuados incluyen "enlazantes flexibles" que generalmente tienen una longitud suficiente para permitir cierto movimiento entre las secuencias peptídicas modificadas y los componentes y las moléculas unidas. Las moléculas enlazantes tienen generalmente una longitud de unos 6-50 átomos. Las moléculas enlazantes también pueden ser, por ejemplo, acetileno de arilo, oligómeros de etilenglicol que contienen 2-10 unidades monoméricas, diaminas, diácidos, aminoácidos o combinaciones de los mismos. Los enlazantes adecuados se pueden seleccionar fácilmente y pueden ser de cualquier longitud adecuada, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 aminoácidos (por ejemplo, Gly).

Los enlazantes flexibles ejemplares incluyen polímeros de glicina ($(\text{G})_n$, polímeros de glicina-serina (por ejemplo, $(\text{GS})_n$, GSGGS_n y GGGS_n , donde n es un entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazantes flexibles. Los polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como una tela neutra entre los componentes. Los enlaces flexibles ejemplares incluyen, entre otros, GGSG, GGS GG, GSGSG, GSGGG, GGS GG y GSSSG.

Las secuencias peptídicas de la invención tienen una o más actividades como se establece en este documento. Un ejemplo de actividad es la actividad de reducción de glucosa. Otro ejemplo de actividad es la estimulación reducida o la formación de carcinoma hepatocelular (HCC), por ejemplo, en comparación con FGF19. Un ejemplo adicional de una actividad es una actividad creciente de lípidos menor o reducida (por ejemplo, triglicéridos, colesterol, no HDL) o actividad creciente de HDL, por ejemplo, en comparación con FGF21. Otro ejemplo de una actividad es una actividad de reducción de masa muscular magra menor o reducida, por ejemplo, en comparación con FGF21. Otro ejemplo de actividad es la unión al receptor del factor de crecimiento de fibroblastos-4 (FGFR4), o la activación de FGFR4, por ejemplo, secuencias peptídicas que se unen a FGFR4 con una afinidad comparable o mayor que la afinidad de unión de FGF19 para FGFR4; y secuencias peptídicas que activan FGFR4 en un grado o cantidad comparable o mayor que FGF19 activa FGFR4. Otros ejemplos de actividades incluyen la regulación a la baja o

reducción de la expresión génica de la aldo-ceto reductasa, por ejemplo, en comparación con FGF19; o la regulación al alza o el aumento de la expresión génica de Slc1a2 en comparación con FGF21.

Más particularmente, las secuencias peptídicas de la invención pueden tener las siguientes actividades: secuencias peptídicas con formación de carcinoma hepatocelular menor (HCC) en comparación con FGF19, o una secuencia de la variante FGF19 que tenga cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDPI, WGDPI, WGDPI, WGDPI, WGDPI o FGDPI sustituido para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19; secuencias peptídicas con mayor actividad de reducción de glucosa en comparación con FGF19, o la secuencia de la variante FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDPI, WGDPI, WGDPI, WGDPI, WGDPI o FGDPI sustituido por la secuencia WGDPI en la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19; secuencias peptídicas con menos actividad creciente de lípidos (por ejemplo, menos triglicéridos, colesterol, no HDL) o más actividad creciente de HDL en comparación con FGF19, o una secuencia de la variante FGF 19 que tiene cualquiera de GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, QPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDPI, WGDPI, WGDPI, WGDPI, WGDPI o FGDPI sustituido para la secuencia WGDPI en los aminoácidos 16-20 de FGF19; y secuencias peptídicas con menos actividad reductora de masa magra en comparación con FGF21.

Más particularmente, las secuencias peptídicas de la invención pueden tener las siguientes actividades: secuencias peptídicas que se unen al receptor del factor de crecimiento de fibroblastos-4 (FGFR4), o activan FGFR4, tales como las secuencias peptídicas que se unen a FGFR4 con una afinidad comparable o mayor que la afinidad de unión de FGF19 para FGFR4; las secuencias peptídicas que activan FGFR4 en un grado o cantidad comparable o superior a la que FGF19 activa a FGFR4; secuencias peptídicas que regulan a la baja o reducen la expresión génica de aldo-ceto reductasa, por ejemplo, en comparación con FGF19; y secuencias peptídicas que regulan al alza o aumentan la familia del vehículo del soluto 1, la expresión génica del miembro 2 (Slc1a2) en comparación con FGF21.

Se pueden determinar actividades tales como, por ejemplo, la formación o tumorigenesis de carcinomas hepatocelulares (CCH), la actividad de reducción de glucosa, el aumento de la actividad de los lípidos o la actividad de reducción de masa magra en un animal, tal como un ratón db/db. La medición de la unión a FGFR4 o la activación de FGFR4 pueden determinarse mediante los ensayos descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, el ejemplo 1) o los conocidos por los expertos en la técnica.

El término "unirse" o "que se une", cuando se utiliza en referencia a una secuencia peptídica, significa que la secuencia peptídica interactúa a nivel molecular. Por lo tanto, una secuencia peptídica que se une a FGFR4 se une a la totalidad o a una parte de la secuencia FGFR4. La unión específica y selectiva puede distinguirse de la unión no específica mediante ensayos conocidos en la técnica (por ejemplo, ensayos de unión competitiva, inmunoprecipitación, ELISA, citometría de flujo, transferencia Western).

Se pueden producir y aislar péptidos y agentes peptidomiméticos utilizando los métodos conocidos en la técnica. Se pueden sintetizar péptidos, total o parcialmente, utilizando métodos químicos (véase, por ejemplo, Caruthers (1980). Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215; Horn (1980); y Banga, A.K., Therapeutic Peptides and Proteins. Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA). La síntesis de péptidos se puede realizar utilizando diversas técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Roberge Science 269:202 (1995); Merrifield, Methods Enzymol. 289:3 (1997)) y puede lograrse una síntesis automatizada, por ejemplo, utilizando el sintetizador de péptidos ABI 431A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se pueden sintetizar péptidos y agentes miméticos peptídicos utilizando metodologías combinatorias. Se pueden sintetizar restos sintéticos y los polipéptidos que incorporan agentes miméticos utilizando una variedad de procedimientos y metodologías conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman, et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY). Pueden ser producidos péptidos modificados por métodos de modificación química (véase, por ejemplo, Belousov, Nucleic Acids Res. 25:3440 (1997); Frenkel, Free Radic. Biol. Med. 19:373 (1995); y Blommers, Biochemistry 33:7886 (1994)). También se pueden preparar variaciones de la secuencia peptídica, derivados, sustituciones y modificaciones utilizando métodos tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), escaneo de alanina y mutagénesis basada en PCR. Se pueden realizar la mutagénesis dirigida al sitio (Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids. Res. 10:6487 (1987)), mutagénesis de casetes (Wells et al., Gene 34:315 (1985)), mutagénesis de selección de restricciones (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317:415 (1986)) y otras técnicas en el ADN clonado para producir las secuencias peptídicas de la invención, variantes, fusiones y quimeras, y variaciones, derivados, sustituciones y modificaciones de los mismos.

Una secuencia peptídica "sintetizada" o "fabricada" es un péptido hecho por cualquier método que implique manipulación artificial. Tales métodos incluyen, entre otros, los anteriores, tales como síntesis química, tecnología de ADN recombinante, fragmentación bioquímica o enzimática de moléculas más grandes, y combinaciones de los anteriores.

También pueden modificarse las secuencias peptídicas que se describen en este documento, incluidas las subsecuencias, las variantes de secuencia y las formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificadas (por ejemplo, las secuencias enumeradas en las Tablas 1-8 y Figura 1), para formar una molécula quimérica. De acuerdo con la invención, se proporcionan secuencias peptídicas que incluyen un dominio heterólogo. Tales

dominios se pueden añadir al extremo amino-terminal o en el carboxi-terminal de la secuencia peptídica. También se pueden colocar dominios heterólogos dentro de la secuencia peptídica, y/o alternativamente flanquearse por secuencias de aminoácidos derivadas de FGF19 y/o FGF21.

5 El término "péptido" también incluye dímeros o multímeros (oligómeros) de péptidos. De acuerdo con la invención, también se proporcionan dímeros o multímeros (oligómeros) de las secuencias peptídicas ejemplificados.

La invención proporciona además moléculas de ácidos nucleicos que codifican secuencias peptídicas de la invención y vectores que incluyan ácidos nucleicos que codifican el péptido. En consecuencia, los "ácidos nucleicos" incluyen los que codifican las secuencias peptídicas de la invención que se describen en el presente documento, siempre y cuando los anteriores conserven al menos una actividad o función detectable o medible. Por ejemplo, una
10 secuencia peptídica de la invención descrita en este documento que conserva cierta capacidad para disminuir o reducir la glucosa, proporciona una homeostasis de glucosa normal o reduce las condiciones histopatológicas asociadas con la hiperglucemia crónica o aguda in vivo, etc.

El ácido nucleico, al que también se lo puede denominar en el presente documento gen, polinucleótido, secuencia de nucleótidos, cebador, oligonucleótido o sonda se refiere a polímeros naturales o modificados que contienen
15 purina y pirimidina de cualquier longitud, ya sea polirribonucleótidos o polidesoxirribonucleótidos o nucleótidos mixtos de polirribonucleótidos-polidesoxirribonucleótidos y sus formas α -anoméricas. Los dos o más polímeros que contienen purina y pirimidina suelen estar unidos por un enlace fosfoéster o un análogo de éste. Los términos se pueden utilizar indistintamente para hacer referencia a todas las formas de ácidos nucleicos, incluyendo ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos pueden ser de una sola hebra, dobles o
20 triples, lineales o circulares. Los ácidos nucleicos incluyen ADN genómico y ADNc. El ácido nucleico de ARN puede empalmarse o no empalmarse al ARNm, ARNr, ARNt o antisentido. Los ácidos nucleicos incluyen los naturales, sintéticos, así como los análogos de nucleótidos y derivados.

Como resultado de la degeneración del código genético, las moléculas de ácido nucleico incluyen secuencias degeneradas con respecto a las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias peptídicas de la
25 invención. Por lo tanto, se proporcionan secuencias de ácido nucleico degeneradas que codifican secuencias peptídicas, incluidas subsecuencias, variantes y formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificadas en este documento (por ejemplo, las secuencias descritas en las Tablas 1-8 y la Figura 1). El término "complementario", cuando se utiliza con referencia a una secuencia de ácidos nucleicos, significa que las regiones a las que hace referencia son 100% complementarias, es decir, exhiben un emparejamiento de bases del 100% sin
30 desapareamiento.

El ácido nucleico se puede producir utilizando cualquiera de una variedad de métodos de clonación y síntesis química estándar conocidos, y puede ser modificado intencionalmente por mutagénesis dirigida al sitio u otras técnicas recombinantes conocidas por los expertos en la técnica. La pureza de los polinucleótidos se puede determinar mediante la secuenciación, electroforesis de gel, espectrometría UV.

35 Los ácidos nucleicos pueden insertarse en una construcción de ácido nucleico en la que la expresión del ácido nucleico está influida o regulada por un "elemento del control de la expresión", al que se hace referencia en el presente documento como un "casete de expresión". La expresión "elemento de control de la expresión" se refiere a uno o más elementos de secuencia de ácido nucleico que regulan o influyen en la expresión de una secuencia de ácido nucleico a la que está unida operativamente. Los elementos de control de la expresión pueden incluir, según
40 corresponda, promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, silenciadores genéticos, un codón de inicio (por ejemplo, ATG) delante de un gen de codificación de proteínas, etc.

Un elemento de control de la expresión unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico controla la transcripción y, cuando es apropiado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. La expresión "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes a los que se hace referencia están en una
45 relación que les permite funcionar de la manera prevista. Típicamente, los elementos de control de la expresión se yuxtaponen en los extremos 5' o 3' de los genes, pero también pueden ser intrónicos.

Los elementos de control de la expresión incluyen elementos que activan la transcripción de forma constitutiva, que son inducibles (es decir, requieren una señal externa o estímulos para la activación), o susceptibles de represión (es decir, requieren una señal para inactivar la transcripción; cuando la señal ya no está más presente, la transcripción se activa o "reprime"). También se incluyen en los casetes de expresión de la invención elementos de control
50 suficientes para hacer que la expresión génica sea controlable para tipos de células o tejidos específicos (es decir, elementos de control específicos del tejido). Normalmente, estos elementos se encuentran arriba o abajo (es decir, 5' y 3') con respecto a la secuencia de codificación. Los promotores se colocan generalmente 5' de la secuencia de codificación. Los promotores, producidos por ADN recombinante o técnicas sintéticas, pueden utilizarse para
55 proporcionar la transcripción de los polinucleótidos de la invención. Un "promotor" normalmente significa un elemento de una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción.

Los ácidos nucleicos pueden insertarse en un plásmido para su transformación en una célula huésped y para su posterior expresión y/o manipulación genética. Un plásmido es un ácido nucleico que se puede propagar de forma

estable en una célula huésped; los plásmidos pueden contener opcionalmente elementos de control de la expresión para impulsar la expresión del ácido nucleico. Para los fines de esta invención, vector es sinónimo de plásmido. Los plásmidos y vectores generalmente contienen al menos un origen de replicación para la propagación en una célula y un promotor. Los plásmidos y vectores también pueden incluir un elemento de control de la expresión para la expresión en una célula huésped y, por lo tanto, son útiles para la expresión y/o manipulación genética de ácidos nucleicos que codifican secuencias peptídicas, expresando secuencias peptídicas en las células huésped y organismos (por ejemplo, un sujeto que necesita tratamiento) o la producción de secuencias peptídicas, por ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "transgén" significa un polinucleótido que se ha introducido en una célula u organismo por arteificio. Por ejemplo, si una célula tiene un transgén se entiende que el transgén ha sido introducido por manipulación genética o por "transformación" de la célula. Una célula o progenie de ésta en la que se ha introducido el transgén se conoce como "célula transformada" o "transformadora". Típicamente, el transgén se incluye en la progenie de la transformadora o se convierte en una parte del organismo que se desarrolla a partir de la célula. Los transgenes pueden insertarse en el ADN cromosómico o mantenerse como un plásmido autorreplicante, YAC, minicromosoma o similares.

Los promotores del sistema bacteriano incluyen T7 y promotores inducibles como pL del bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y promotores sensibles a la tetraciclina. Los promotores del sistema celular de insectos incluyen promotores constitutivos o inducibles (por ejemplo, ecdisona). Los promotores constitutivos de células de mamíferos incluyen SV40, RSV, virus del papiloma bovino (BPV) y otros promotores de virus, o promotores inducibles derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor de la metalotionina IIA; promotor de choque térmico) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; la repetición terminal larga del virus del tumor mamario de ratón inducible). Alternativamente, un genoma retroviral puede ser modificado genéticamente para introducir y dirigir la expresión de una secuencia peptídica en las células huésped apropiadas.

Como los métodos y usos descritos en este documento incluyen la administración in vivo, los sistemas de expresión incluyen además vectores diseñados para su uso in vivo. Entre los ejemplos particulares no limitadores se incluyen vectores adenovirales (patentes de EE.UU. Nos. 5.700.470 y 5.731.172), los vectores asociados a adenovirales (patente de EE.UU. No. 5.604.090), vectores del virus del herpes simple (patente de EE.UU. No. 5.501.979), vectores retrovirales (patentes de EE.UU. Nos. 5.624.820, 5.693.508 y 5.674.703), vectores BPV (patente de EE.UU. No. 5.719.054), vectores CMV (patente de EE.UU. No. 5.561.063) y parvovirus, rotavirus, virus Norwalk y vectores lentivirales (véase p.ej., la patente de los Estados Unidos No. 6.013.516). Los vectores incluyen aquellos que entregan genes a las células del tracto intestinal, incluyendo las células madre (Croyle et al., Gene Ther. 5:645 (1998); S. J. Henning, Adv. Drug Deliv. Rev. 17:341 (1997), patentes de los Estados Unidos No. 5.821.235 y 6.110.456). Muchos de estos vectores han sido aprobados para estudios en humanos.

Los vectores de levadura incluyen promotores constitutivos e inducibles (véase, por ejemplo, Ausubel et al., En: Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ch. 13, ed., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988; Grant et al., Methods in Enzymology, 153:516 (1987), eds. Wu & Grossman; Bitter Methods in Enzymology, 152:673 (1987), eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y.; y, Strathern et al., The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (1982) eds. Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II). Se puede utilizar un promotor constitutivo de levadura como ADH o LEU2 o un promotor inducible como GAL (R. Rothstein, En: DNA Cloning, A Practical Approach, Vol. 11, Ch. 3, ed. D.M. Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986). Se conocen en la técnica vectores que facilitan la integración de secuencias de ácido nucleico ajeno en un cromosoma de levadura, a través de la recombinación homóloga, por ejemplo. Se utilizan típicamente cromosomas artificiales de levadura (YAC) cuando los polinucleótidos insertados son demasiado grandes para los vectores más convencionales (por ejemplo, más de aproximadamente 12 Kb).

Los vectores de expresión también pueden contener un marcador seleccionable que confiera resistencia frente a alguna presión selectiva o frente a un marcador identificable (por ejemplo, la beta-galactosidasa), lo que permite a las células que disponen del vector poder seleccionarlas, hacerlas crecer y expandirlas. Alternativamente, un marcador seleccionable puede estar en un segundo vector que se co-transfecta en una célula huésped con un primer vector que contiene un ácido nucleico que codifica una secuencia peptídica. Los sistemas de selección incluyen, entre otros, el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), el gen de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026 (1962)), y genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) que se pueden emplear en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, la resistencia antimetabolito se puede utilizar como base de la selección para dhfr, que confiere resistencia frente al metotrexato (O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); el gen gpt, que confiere resistencia frente al ácido micofenólico (Mulligan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); el gen de la neomicina, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1(1981)); puromicina; y gen de higromicina, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Los genes seleccionables adicionales incluyen trpB, que permiten a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047 (1988)); y ODC (ornitina descarboxilasa), que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue (1987) En: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory).

De acuerdo con la invención, se proporcionan células transformadas (in vitro, ex vivo e in vivo) y células huésped que producen un péptido de la invención, donde la expresión del péptido de la invención es conferida por un ácido que codifica el péptido de la invención. Las células transformadas y huésped que expresan secuencias peptídicas de la invención suelen incluir un ácido nucleico que codifica la secuencia peptídica de la invención. En una realización, una célula transformada o huésped es una célula procariótica. En otra realización, una célula transformada o huésped es una célula eucariota. En varias realizaciones, la célula eucariota es una célula de levadura o mamífero (por ejemplo, humana, primate, etc.).

Tal como se utiliza en el presente documento, una célula "transformada" o "huésped" es una célula en la que se introduce un ácido nucleico que se puede propagar y/o transcribir para la expresión de una secuencia peptídica codificada. El término también incluye cualquier progenie o subclones de la célula huésped.

Las células transformadas y huésped incluyen, entre otras, microorganismos tales como bacterias y levaduras; y células de plantas, insectos y mamíferos. Por ejemplo, bacterias transformadas con ácidos nucleicos bacteriófagos recombinantes, ácidos nucleicos plasmídicos o vectores de expresión de ácidos nucleicos cósmidos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti); sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión del virus recombinante (por ejemplo, baculovirus); y sistemas celulares animales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus de vacuna), o sistemas celulares animales transformados diseñados para la propagación o expresión transitoria o estable.

Para los usos y métodos de la terapia génica, una célula transformada puede estar en un sujeto. La célula en el sujeto se puede transformar con un ácido nucleico que codifica una secuencia peptídica de la invención como se establece en este documento in vivo. Alternativamente, una célula se puede transformar in vitro con un transgén o polinucleótido, y luego trasplantarla en un tejido de sujeto con el fin de realizar el tratamiento. Alternativamente, un aislado celular primario o una línea celular establecida se puede transformar con un transgén o polinucleótido que codifique una variante de FGF19 y/o FGF21 o una secuencia de fusión/quimérica (o variante) de los mismos, tal como una secuencia peptídica quimérica que incluya todo o una parte de FGF19, o que incluya la totalidad o una parte de FGF21, y luego, opcionalmente, ser trasplantado en un tejido de un sujeto.

Las células diana no limitantes para la expresión de secuencias peptídicas, particularmente para la expresión in vivo, incluyen células de páncreas (células de islote), células musculares, células mucosas y células endocrinas. Tales células endocrinas pueden proporcionar una producción inducible (secreción) de una variante de FGF19 y/o FGF21, o una secuencia de fusión/quimérica (o variante), tal como una secuencia peptídica quimérica que incluya la totalidad o una parte de FGF19, o que incluya la totalidad o una parte de FGF21. Otras células para transformar incluyen células madre u otras células multipotentes o pluripotentes, por ejemplo, células progenitoras que se diferencian en las diversas células del páncreas (células de islote), células musculares, células mucosas y células endocrinas. El reconocimiento de células madre proporciona una expresión a largo plazo de las secuencias peptídicas de la invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término "cultivado", cuando se utiliza con referencia a una célula, significa que la célula se cultiva in vitro. Un ejemplo particular de dicha célula es una célula aislada de un sujeto, y cultivada o adaptada para el crecimiento en un cultivo de tejidos. Otro ejemplo es una célula manipulada genéticamente in vitro, y trasplantada de nuevo en el mismo sujeto o en otro diferente.

El término "aislado", cuando se utiliza con referencia a una célula, significa una célula que está separada de su entorno in vivo natural. Las células "cultivadas" y "aisladas" pueden ser manipuladas artificialmente, tal como transformadas genéticamente. Estos términos incluyen cualquier progenie de las células, incluyendo células de progenie que pueden no ser idénticas a la célula parental debido a mutaciones que ocurren durante la división celular. Los términos no incluyen a cualquier ser humano.

Los ácidos nucleicos que codifican las secuencias peptídicas de la invención se pueden introducir para una expresión estable en las células de un organismo completo. Estos organismos, incluidos los animales transgénicos no humanos, son útiles para estudiar el efecto de la expresión de péptidos en el animal entero y su beneficio terapéutico. Por ejemplo, como se discute en el presente documento, la producción de una variante de FGF19 y/o FGF21 o una secuencia de fusión/quimérica (o variante) de la misma, tal como una secuencia peptídica quimérica que incluya la totalidad o una parte de FGF19, o que incluya la totalidad o una parte de FGF21 como se establece en el presente documento, en ratones redujo el nivel de glucosa y se comportó de forma antidiabética.

También son útiles para introducir proteínas terapéuticas cepas de ratones que desarrollan alguna enfermedad en particular (por ejemplo, la diabetes, los trastornos degenerativos, el cáncer, etc.), o que son susceptibles de desarrollarla, como se describe en el presente documento, con el fin de estudiar el efecto de la expresión de la proteína terapéutica en el ratón susceptible de desarrollar la enfermedad. Los modelos animales transgénicos y genéticos que son susceptibles de desarrollar enfermedades o afecciones fisiológicas particulares, tales como los ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina (STZ), son dianas adecuadas para expresar las variantes de

FGF19 y/o FGF21, secuencias de fusiones/quiméricas (o variantes) de las mismas, tales como una secuencia peptídica quimérica que incluya todo o parte del FGF19, o que incluya la totalidad o una parte de FGF21, como se establece en el presente documento. Por lo tanto, se describen en el presente documento animales transgénicos no humanos que producen una variante de FGF19 y/o FGF21, o una secuencia de fusión/quimérica (o variante) de los mismos, tal como una secuencia peptídica quimérica que incluya la totalidad o una porción de FGF19, o que incluya la totalidad o una parte de FGF21, cuya producción no se da naturalmente en el animal que es conferido por un transgén presente en las células somáticas o germinales del animal.

La expresión "animal transgénico" se refiere a un animal cuyas células somáticas o de la línea germinal llevan información genética recibida, directa o indirectamente, por manipulación genética deliberada a nivel subcelular, tal como por microinyección o infección mediante virus recombinante. El término "transgénico" incluye además células o tejidos (es decir, "células transgénicas", "tejidos transgénicos") obtenidos de un animal transgénico manipulado genéticamente como se describe en el presente documento. En el contexto actual, un "animal transgénico" no abarca los animales producidos por el cruce clásico o la fertilización in vitro, sino que denota animales en los que una o más células reciben una molécula de ácido nucleico. Los animales transgénicos pueden ser heterocigóticos u homocigóticos con respecto al transgén. Los métodos para producir animales transgénicos, incluidos ratones, ovejas, cerdos y ranas, son bien conocidos en la técnica (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses Nos. 5.721.367, 5.695.977, 5.650.298 y 5.614.396) y, como tales, son incluidos también.

Las secuencias peptídicas, los ácidos nucleicos que codifican secuencias peptídicas, vectores y células huésped transformadas que expresan secuencias peptídicas incluyen formas aisladas y purificadas. El término "aislado", cuando se utiliza como modificador de una composición de la invención, significa que la composición está separada, sustancialmente de forma completa o, al menos, en parte, de uno o más componentes en un entorno. Generalmente, las composiciones que existen en la naturaleza, cuando están aisladas, están sustancialmente libres de uno o más materiales con los que normalmente se asocian en la naturaleza, por ejemplo, una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos o membrana celular. El término "aislado" no excluye formas físicas alternativas de la composición, tales como variantes, modificaciones o formas derivatizadas, fusiones y quimeras, multímeros/oligómeros, etc., o formas expresadas en células huésped. El término "aislado" tampoco excluye las formas (por ejemplo, composiciones farmacéuticas, composiciones combinadas, etc.) en las que hay combinaciones en ellas, cualquiera de las cuales se produce de forma artificial.

Una composición "aislada" también puede ser "purificada" cuando está libre de algunos, un número sustancial, o la mayoría, o todos, de uno o más materiales, tal como un contaminante o una sustancia o material no deseado. Las secuencias peptídicas de la invención generalmente no se conocen o no se piensa que existan en la naturaleza. Sin embargo, para una composición que existe en la naturaleza, una composición aislada generalmente estará libre de algunos, un número sustancial, o la mayoría o todos los demás materiales con los que normalmente se asocia en la naturaleza. Por lo tanto, una secuencia peptídica aislada que también se produce en la naturaleza no incluye a los polipéptidos o polinucleótidos presentes entre los millones de otras secuencias, tales como las proteínas de una biblioteca de proteínas o ácidos nucleicos en una biblioteca genómica o de ADNc, por ejemplo. Una composición "purificada" incluye combinaciones con una o más moléculas inactivas o activas. Por ejemplo, una secuencia peptídica de la invención combinada con otro medicamento o agente, tal como un medicamento para bajar la glucosa o un agente terapéutico, por ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "recombinante", cuando se utiliza como un modificador de las secuencias peptídicas, ácidos nucleicos que codifican las secuencias peptídicas, etc., significa que las composiciones han sido manipuladas (i.e., alteradas genéticamente) de una manera que generalmente no ocurre en la naturaleza (p. ej., in vitro). Un ejemplo particular de un péptido recombinante sería cuando una secuencia peptídica de la invención se expresa mediante una célula transfectada con un ácido nucleico que codifica la secuencia peptídica. Un ejemplo particular de un ácido nucleico recombinante sería un ácido nucleico (p. ej., genómica o ADNc) que codificaría una secuencia peptídica clonada en un plásmido, con o sin regiones de 5', 3' o intrones con las que el gen estaría normalmente en posición contigua en el genoma del organismo. Otro ejemplo de péptido recombinante o ácido nucleico es una secuencia híbrida o de fusión, tal como una secuencia peptídica quimérica que comprende una porción de FGF19 y una porción de FGF21.

De acuerdo con la invención, se proporcionan composiciones y mezclas de secuencias peptídicas de la invención. En una realización, una mezcla incluye una o más secuencias peptídicas y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la mezcla incluye una o más secuencias peptídicas y un medicamento adjunto o agente terapéutico, tal como un agente antidiabético, o para la reducción de glucosa, fármaco o agente terapéutico. A continuación se exponen ejemplos de fármacos y agentes terapéuticos. También se proporcionan combinaciones, como una o más secuencias peptídicas en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, con uno o más de un fármaco antidiabético o un agente terapéutico o fármaco para bajar la glucosa. Tales combinaciones de la secuencia peptídica de la invención con otro medicamento o agente, tal como un medicamento para bajar la glucosa o un agente terapéutico, por ejemplo, son útiles de acuerdo con los métodos y usos de la invención, por ejemplo, para el tratamiento de un sujeto.

Las combinaciones también incluyen la incorporación de secuencias peptídicas o ácidos nucleicos de la invención en partículas o sustancias poliméricas, tales como poliésteres, carbohidratos, ácidos de poliamina, hidrogel, polivinil

- pirrolidona, etilen-vinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina o copolímeros de lactida/glicólico, copolímeros de polilactida/glicólido o copolímeros de etilenvinilacetato; trampa en microcápsulas preparadas por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, mediante el uso de microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina, o microcápsulas de poli(metilmetakrolato), respectivamente;
- 5 incorporación en sistemas de administración y dispersión de fármacos coloides, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos (por ejemplo, grupos de acilo N-graso como N-lauroilo, N-oleoilo, aminas grasas como dodecil-amina, oleoil-amina, etc., véase la patente estadounidense No 6.638.513), incluidas las emulsiones de aceite en agua, las micelas, las micelas mixtas y los liposomas, por ejemplo.
- 10 Los péptidos de la invención, como se establece en este documento, se pueden utilizar para modular el metabolismo de la glucosa y facilitar el transporte de la glucosa en la sangre a los órganos metabólicos clave como el músculo, el hígado y la grasa. Tales secuencias peptídicas se pueden producir en cantidades suficientes o eficaces para restaurar la tolerancia a la glucosa y/o para mejorar o proporcionar homeostasis de glucosa normal.
- 15 Como se describe en el presente documento, la administración de diversas variantes de FGF19 y/FGF21 y las secuencias peptídicas de fusión a ratones redujeron con éxito los niveles de glucosa. Además, a diferencia de FGF19, ciertas secuencias peptídicas no estimularon ni indujeron la formación de HCC o la tumorigenesis en ratones. Así, la administración de los péptidos de la invención, en un animal, ya sea por métodos directos o indirectos in vivo o ex vivo (por ejemplo, la administración de la variante o el péptido de fusión, un ácido nucleico que codifica la variante o el péptido de fusión, o un célula transformada o vector de terapia génica que expresa la
- 20 variante o el péptido de fusión), se puede utilizar para tratar los diversos trastornos.
- En consecuencia, la invención incluye métodos y usos in vitro, ex vivo e in vivo (por ejemplo, en un sujeto). Tales métodos y usos se pueden poner en práctica con cualquiera de las secuencias peptídicas de la invención establecidas en este documento.
- 25 De acuerdo con la invención, se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de padecer un trastorno. En varias realizaciones, los métodos incluyen administrar una secuencia peptídica de la invención a un sujeto en una cantidad eficaz para el tratamiento del trastorno.
- Los trastornos ejemplares tratables, prevenibles y similares con los péptidos de la invención, y los métodos y usos, incluyen enfermedades metabólicas y trastornos. Ejemplos no limitativos de enfermedades y trastornos incluyen: 1. Trastornos de la utilización de la glucosa y las secuencias asociadas a estos, incluyendo la diabetes mellitus (Tipo 1 y Tipo 2), diabetes gestacional, hiperglucemia, resistencia a la insulina, metabolismo de glucosa anormal, "prediabetes" (disglucemia de ayuno (IFG, por sus siglas en inglés) o intolerancia a la glucosa (IGT, por sus siglas en inglés)), y otros trastornos fisiológicos asociados con la condición hiperglucémica, o que son el resultado de ésta, incluyendo, por ejemplo, cambios histopatológicos, tales como la destrucción de células β pancreáticas. Para el
- 30 tratamiento, las secuencias peptídicas de la invención se pueden administrar a sujetos con un nivel de glucosa plasmática en ayunas (FPG) superior a aproximadamente 100 mg/dl. Las secuencias peptídicas de la invención también pueden ser útiles en otros trastornos hiperglucémicos, como el daño renal (por ejemplo, daño de túbulo o nefropatía), degeneración hepática, daño ocular (por ejemplo, retinopatía diabética o cataratas) y trastornos del pie diabético; 2. Dislipidemias y sus secuelas tales como, por ejemplo, aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias, trastornos cerebrovasculares y similares; 3. Otras afecciones que pueden estar asociadas con el síndrome metabólico, como la obesidad y el índice de masa corporal elevado (incluidas sus condiciones comórbidas, tales como, entre otras, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), y el síndrome de ovario poliquístico (SOP)), y también incluyen la trombosis, estados hipercoagulables y protrombóticos (arteriales y venosos), hipertensión, enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca; 4. Trastornos o afecciones en las que intervienen reacciones inflamatorias,
- 35 como la aterosclerosis, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (p. ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), asma, lupus eritematoso, artritis u otros trastornos reumáticos inflamatorios; 5. Trastornos del ciclo celular o procesos de diferenciación celular tales como tumores de células adiposas, carcinomas lipomatosos incluyendo, por ejemplo, liposarcomas, tumores sólidos, y neoplasias; 6. Enfermedades neurodegenerativas y/o trastornos desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico y/o enfermedades neurológicas que impliquen procesos neuroinflamatorios y/u otras neuropatías periféricas, incluida la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, la leucoencefalopatía multifocal progresiva y el síndrome de Guillain-Barré; 7. trastornos de la piel y dermatológicos y/o trastornos de los procesos de cicatrización de las heridas, incluyendo dermatosis eritematosas-escamosas; y 8. Otros trastornos como el síndrome X, la osteoartritis y el síndrome de dificultad respiratoria aguda.
- 40
- 45
- 50
- 55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hiperglucémico" o "hiperglucemia", cuando se utiliza en referencia a una condición de un sujeto, significa un nivel transitorio o crónico anormalmente alto de glucosa presente en la sangre de un sujeto. La condición puede estar causada por un retraso en el metabolismo de la glucosa o absorción de tal manera que el sujeto exhibe intolerancia a la glucosa o un estado de glucosa elevada que no se encuentra típicamente en los sujetos normales (p. ej., en sujetos prediabéticos intolerantes a la glucosa en riesgo de desarrollar diabetes, o en sujetos diabéticos). Los niveles de glucosa plasmática en ayunas (FPG) para la
- 60

normoglucemia son inferiores a aproximadamente 100 mg/dl, para un metabolismo de la glucosa alterado, entre aproximadamente 100 y 126 mg/dl, y para los diabéticos superiores a aproximadamente 126 mg/dl.

Como se describe en el presente documento, la invención incluye métodos de tratamiento (por ejemplo, la mejora) de la obesidad o una masa corporal indeseable (por ejemplo, un índice de masa corporal mayor que lo normal, o "IMC" en relación con un sujeto similar apropiado de edad, género, raza, etc.). Así, en diversas realizaciones, un método de la invención, por ejemplo, para el tratamiento de la obesidad o una masa corporal indeseable (incluidas las condiciones comórbidas de la obesidad, por ejemplo, apnea obstructiva del sueño, artritis, cáncer (por ejemplo, mama, endometrio y colon), cálculos biliares o hiperglucemia, incluye poner en contacto o administrar un péptido de la invención en una cantidad eficaz para tratar la obesidad o una masa corporal indeseable. En realizaciones particulares, un sujeto tiene un índice de masa corporal superior a 25, por ejemplo, 25-30, 30-35, 35-40 o mayor que 40.

Además, la invención incluye métodos de tratamiento de niveles indeseables o LDL sérico/plasma anormalmente elevado, VLDL, triglicéridos o colesterol, todos los cuales, solos o en combinación, pueden conducir, por ejemplo, a la formación de placas, estrechamiento y bloqueo de los vasos sanguíneos, y un mayor riesgo de hipertensión, accidentes cerebrovasculares y enfermedad de las arterias coronarias. Tales trastornos pueden deberse, por ejemplo, a una predisposición genética o a la dieta, por ejemplo.

El término "sujeto" se refiere a un animal. Típicamente, el animal es un mamífero que se beneficiaría del tratamiento con una secuencia peptídica de la invención. Ejemplos particulares incluyen primates (por ejemplo, seres humanos), perros, gatos, caballos, vacas, cerdos y ovejas.

Los sujetos incluyen aquellos que tienen un trastorno, p. ej., un trastorno hiperglucémico, como la diabetes, o sujetos que no tienen un trastorno, pero que pueden estar en riesgo de desarrollar el trastorno, por ejemplo, sujetos prediabéticos con niveles de FPG superiores a 100 mg/dl, por ejemplo, entre unos 100 y 126 mg/dl. Los sujetos en riesgo de desarrollar un trastorno incluyen, por ejemplo, aquellos cuya dieta puede contribuir al desarrollo de una hiperglucemia aguda o crónica (por ejemplo, la diabetes), masa corporal indeseable u obesidad, así como aquellos que pueden tener antecedentes familiares o predisposición genética del desarrollo de una hiperglucemia aguda o crónica, o una masa corporal indeseable u obesidad.

Como se describe en el presente documento, los métodos de tratamiento incluyen poner en contacto o administrar un péptido de la invención en una cantidad eficaz para lograr un resultado deseado o dar lugar a un sujeto. Un tratamiento que da una consecuencia o resultado deseado incluye disminuir, reducir o prevenir la gravedad o la frecuencia de uno o más síntomas de la afección en el sujeto, p. ej., una mejora en la condición del sujeto o un "efecto beneficioso" o "efecto terapéutico." Por lo tanto, el tratamiento puede disminuir o reducir o prevenir la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas del trastorno, estabilizar o inhibir la progresión o el empeoramiento del trastorno y, en algunos casos, revertir el trastorno, de manera transitoria (por ejemplo, durante 1-6, 6-12, o 12-24 horas), a medio plazo (por ejemplo, 1-6, 6-12, 12-24 o 24-48 días) o a largo plazo (por ejemplo, durante 1-6, 6-12, 12-24, 24-48 semanas, o más de 24-48 semanas). Así, en el caso de un trastorno hiperglucémico, por ejemplo, el tratamiento puede disminuir o reducir la glucosa en sangre, mejorar la tolerancia a la glucosa, mejorar el metabolismo de la glucosa, proporcionar homeostasis normal de glucosa, disminuir o reducir la resistencia a la insulina, disminuir o reducir los niveles de insulina, o disminuir, prevenir, mejorar o revertir el síndrome metabólico, o un cambio histopatológico asociado con un trastorno hiperglucémico o que resulte de éste, tal como la diabetes.

Por ejemplo, una secuencia, método o uso de péptidos puede disminuir o reducir la glucosa en uno o más sujetos con niveles de FPG superiores a 100 mg/dl, por ejemplo, entre aproximadamente 100 y 125 mg/dl, o superiores a 125 mg/dl, en un 5-10%, 10-20%, 20-30%, o 30-50% , o más o, por ejemplo, de más de 200 mg/dl a menos de 200 mg/dl, para más de 150 mg/dl a menos de 150 mg/dl, de más de 125 mg/dl a menos de 125 mg/dl, etc. Además, una secuencia peptídica, método o uso puede disminuir o reducir la glucosa, por ejemplo, para sujetos pre-diabéticos o diabéticos (por ejemplo, Tipo 2) con niveles basales de HbA1c superiores a aproximadamente 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o 10%, en particular 5%, 6% o 7%.

Ejemplos no limitantes de una mejora de un cambio histopatológico asociado con una condición hiperglucémica incluyen, por ejemplo, disminuir, inhibir, reducir o detener la destrucción o degeneración de las células pancreáticas (por ejemplo, células β), daños en el riñón tal como la calcificación o la nefropatía, degeneración hepática, daño ocular (p. ej., retinopatía diabética, cataratas), pie diabético, ulceraciones en la mucosa como en boca y encías, periodontitis, sangrado excesivo, curación lenta o retrasada de lesiones o heridas (p. ej., que conducen a carbuncles diabéticos), infecciones de la piel y otros trastornos cutáneos, enfermedades cardiovasculares y coronarias, enfermedad vascular periférica, accidente cerebrovascular, dislipidemia, hipertensión, obesidad, o el riesgo de desarrollar cualquiera de los anteriores. La mejora de un índice de masa corporal indeseable u obesidad puede incluir, por ejemplo, una reducción de la masa corporal (como lo refleja el IMC o similares) o una mejora en un trastorno asociado, tal como una disminución de los niveles de triglicéridos, colesterol, LDL o VLDL, una disminución de la presión sanguínea, una disminución en el engrosamiento intimal de los vasos sanguíneos, una disminución o reducción del riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular, o un accidente cerebrovascular, una disminución de la frecuencia cardíaca en reposo, etc.

Una "cantidad efectiva" o una "cantidad suficiente" para su uso y/o para el tratamiento de un sujeto se refieren a una cantidad que proporciona, en dosis únicas o múltiples, solo, o en combinación con una o más composiciones (agentes terapéuticos tales como un medicamento o tratamiento para la hiperglucemia), tratamientos, protocolos o agentes de regímenes terapéuticos, una respuesta detectable de cualquier duración (transitoria, a medio o largo plazo), un resultado deseado o un beneficio objetivo o subjetivo para un sujeto de cualquier grado medible o detectable o durante cualquier duración (por ejemplo, durante horas, días, meses, años o hasta su curación). Tales cantidades suelen ser eficaces para mejorar algún trastorno, o uno, múltiples o todos los síntomas adversos, consecuencias o complicaciones del trastorno, hasta un grado medible; aunque la reducción o inhibición de la progresión o empeoramiento del trastorno sería un resultado satisfactorio.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mejorar" significa una mejora en el trastorno del sujeto, una reducción en la gravedad del trastorno, o una inhibición de la progresión o empeoramiento del trastorno (por ejemplo, al estabilizar el trastorno). En el caso de un trastorno hiperglucémico (p. ej., la diabetes, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, el síndrome metabólico, etc.), por ejemplo, una mejora puede ser la reducción o disminución de la glucosa en sangre, una reducción de la resistencia a la insulina, una reducción del glucagón, una mejora en la tolerancia a la glucosa, metabolismo de la glucosa u homeostasis. Una mejora en un trastorno hiperglucémico también puede incluir una mejor función pancreática (p. ej., para inhibir o prevenir la destrucción de células/islotos o mejorar el número y/o la función de las células β), una disminución de una patología asociada o resultante del trastorno, tal como una mejora en la histopatología de un tejido u órgano afectado, como se establece en el presente documento. En el caso de exhibir una masa corporal indeseable o padecer obesidad, por ejemplo, una mejora puede ser la disminución en el aumento de peso, una reducción de la masa corporal (como se refleja en la reducción del IMC, por ejemplo) o una mejora en una condición asociada con la obesidad de la masa corporal indeseable, por ejemplo, como se establece en el presente documento (p. ej., una reducción o disminución de la glucosa en sangre, triglicéridos, colesterol, niveles de LDL o VLDL, una disminución de la presión arterial, una disminución del engrosamiento intimal de los vasos sanguíneos, etc.).

Por lo tanto, no es necesario que un beneficio o mejora terapéutica sea una ablación completa de uno, la mayoría o todos los síntomas, complicaciones, consecuencias o causas subyacentes asociadas con el trastorno o la enfermedad. Por lo tanto, se logra un punto final satisfactorio cuando hay una mejora incremental transitoria, a medio o largo plazo en la condición de un sujeto, o una reducción parcial en la aparición, frecuencia, gravedad, progresión o duración, o inhibición o reversión, de uno o más síntomas adversos asociados o complicaciones o consecuencias o causas subyacentes, empeoramiento o progresión (por ejemplo, estabilización de uno o más síntomas o complicaciones de la afección, trastorno o enfermedad), del trastorno o enfermedad, durante un determinado tiempo (horas, días, semanas, meses, etc.).

Por lo tanto, en el caso de un trastorno tratable por una secuencia peptídica de la invención, la cantidad de péptido suficiente para mejorar un trastorno dependerá del tipo, gravedad y extensión, o duración del trastorno, el efecto terapéutico o resultado deseado, y puede ser fácilmente determinado por los expertos en la técnica. Las cantidades apropiadas también dependerán del sujeto a tratar (p. ej., la biodisponibilidad en torno al sujeto, género, edad, etc.). Por ejemplo, una restauración transitoria o parcial de la homeostasis normal de glucosa en un sujeto puede reducir la cantidad de dosis o la frecuencia de la inyección de insulina, aunque no se haya producido una liberación total de la insulina.

Una cantidad efectiva se puede determinar, por ejemplo, midiendo uno o más efectos fisiológicos relevantes. En un ejemplo particular no limitador en el caso de una afección hiperglucémica, se puede utilizar una reducción o disminución de la glucosa en sangre o una mejora en la prueba de tolerancia respecto a la glucosa para determinar si la cantidad de secuencia peptídica de la invención es eficaz para tratar una condición hiperglucémica. En otro ejemplo particular no limitador, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para reducir o disminuir cualquier nivel (por ejemplo, un nivel de referencia) de la FPG, en el que, por ejemplo, una cantidad suficiente para reducir un nivel de FPG superior a 200 mg/dl a menos de 200 mg/dl, una cantidad suficiente para reducir un nivel de FPG entre 175 mg/dl y 200 mg/dl a menos del nivel de administración previa, una cantidad suficiente para reducir un nivel de FPG entre 150 mg/dl y 175 mg/dl a menos del nivel de administración previa, una cantidad suficiente para reducir un nivel de FPG entre 125 mg/dl y 150 mg/dl a menos del nivel de administración previa, y así sucesivamente (por ejemplo, reducir los niveles de FPG a menos de 125 mg/dl, a menos de 120 mg/dl, a menos de 115 mg/dl, a menos de 110 mg/dl, etc.). En el caso de los niveles de HbA1c, una cantidad efectiva incluye una cantidad suficiente para reducir o hacer disminuir los niveles en más de un 10% a 9%, en más de un 9% a un 8%, en más de un 8% a un 7%, en más de un 7% a un 6%, en más de un 6% a un 5%, y así sucesivamente. Más particularmente, una reducción o disminución de los niveles de HbA1c en aproximadamente un 0,1%, 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, o más es una cantidad efectiva de acuerdo con la invención. En otro ejemplo particular no limitador en el caso de exhibir una masa corporal indeseable u obesidad, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para disminuir o reducir el índice de masa corporal (IMC) de un sujeto, una disminución o reducción de la glucosa, una disminución o reducción de los niveles en suero/plasmáticos de triglicéridos, lípidos, colesterol, ácidos grasos, LDL y/o VLDL. En otros ejemplos particulares no limitantes, una cantidad es una cantidad suficiente para disminuir o reducir cualquiera de los parámetros antes mencionados, por ejemplo, aproximadamente 0,1%, 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50% o más.

Los métodos y usos de la invención para el tratamiento de un sujeto son aplicables a la profilaxis para prevenir un trastorno en un sujeto, tal como un trastorno hiperglucémico, o el desarrollo de una masa corporal indeseable u obesidad. Alternativamente, los métodos y usos se pueden poner en práctica durante el tratamiento a un sujeto, o después de éste. Por ejemplo, antes, durante o después o a continuación del tratamiento al sujeto de reducción de la concentración de glucosa utilizando insulina u otro fármaco o agente terapéutico que disminuya la glucosa, por ejemplo, un método o uso de la invención puede ser de nuevo, por ejemplo, una secuencia peptídica de la invención administrada al sujeto. Además, una composición tal como una secuencia peptídica de la invención se puede combinar con otro medicamento o agente, tal como un medicamento o agente terapéutico para disminuir la concentración de glucosa, por ejemplo.

En consecuencia, los métodos y usos de la invención para el tratamiento de un sujeto se pueden poner en práctica antes, sustancialmente simultáneamente o después de otro tratamiento, y se pueden complementar con otras formas de terapia. Las terapias suplementarias incluyen otros tratamientos de reducción de la glucosa, tales como los tratamientos con insulina, un potenciador de la sensibilidad a la insulina y otros tratamientos farmacológicos, un cambio en la dieta (bajo nivel de azúcar, grasas, etc.), cirugía de pérdida de peso (reducción del volumen del estómago por bypass gástrico, gastrectomía), bandas gástricas, globos gástricos, mangas gástricas, etc. Por ejemplo, un método o uso de la invención para tratar un trastorno hiperglucémico o de resistencia a la insulina se puede utilizar en combinación con medicamentos u otras composiciones farmacéuticas que reduzcan la glucosa o aumenten la sensibilidad frente a la insulina en un sujeto. Los medicamentos para el tratamiento de la diabetes incluyen, por ejemplo, biguanidas y sulfonilureas (p. ej., tolbutamida, clorpropamida, acetohexamida, tolazamida, glibenclamida y glipizida), tiazolidindionas (rosiglitazona, pioglitazona), análogos de GLP-1, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), formulaciones de bromocriptina (por ejemplo, y secuestrantes del ácido biliar (p. ej., colessevelam) e insulina (bolo y análogos basales), metformina (p. ej., hidrocloreto de metformina) con o sin tiazolidindiona (TZD) e insulina (bolo y análogos basales), metformina (p. ej., hidrocloreto de metformina) con o sin tiazolidindiona (TZD) e inhibidores SGLT-2. Los medicamentos para la supresión del apetito también son bien conocidos y se pueden utilizar en combinación con los métodos de la invención. Las terapias suplementarias se pueden administrar antes, simultáneamente o a continuación de los métodos y usos de la invención.

Las secuencias peptídicas de la invención pueden formularse en una dosis unitaria o en una forma de dosificación unitaria. En una realización particular, una secuencia peptídica está en una cantidad eficaz para tratar a un sujeto que necesita de tratamiento, por ejemplo, debido a una hiperglucemia. Las dosis unitarias ejemplares oscilan entre 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 o 2500-5000, 5000-25.000, 25.000-50.000 ng; de aproximadamente 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 o 2500-5000, 5000-25.000, 25.000-50.000 µg; y de aproximadamente 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 o 2500-5000, 5000-25.000, 25.000-50.000 mg.

Las secuencias peptídicas de la invención se pueden administrar para proporcionar el efecto previsto como una dosis única o dosis múltiples, por ejemplo, en una cantidad eficaz o suficiente. Las dosis ejemplares oscilan entre 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 o 2500-5000, 5000-25.000, 25.000-50.000 pg/kg; de aproximadamente 50-500, 500-5000, 5000-25.000 o 25.000-50.000 ng/kg; y de aproximadamente 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 o 2500-5000, 5000-25.000, 25.000-50.000 µg/kg. Se pueden administrar dosis únicas o múltiples, por ejemplo, varias veces al día, en días consecutivos, días alternos, semanales o intermitentemente (por ejemplo, dos veces por semana, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas, o una vez cada 2, 3, 4, 5 ó 6 meses).

Las secuencias peptídicas de la invención pueden administrarse y los métodos pueden ser puestos en práctica a través de la administración sistémica, regional o local, por cualquier vía. Por ejemplo, una secuencia peptídica se puede administrar por vía parenteral (p. ej., por vía subcutánea, por vía intravenosa, intramuscular o intraperitoneal), por vía oral (p. ej., ingestión, bucal o sublingual), inhalación, intradérmica, intracavidad, intracranealmente, transdérmicamente (tópica), transmucosa o rectal. Las secuencias peptídicas de la invención y los métodos de la invención, incluidas las composiciones farmacéuticas, pueden administrarse a través de un sistema de administración (micro)encapsulado o empaquetarse en un implante para su administración.

La invención proporciona además "composiciones farmacéuticas", que incluyen una secuencia peptídica (o secuencias) de la invención, y uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables. En realizaciones particulares, una secuencia o varias secuencias peptídicas están presentes en una cantidad terapéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden utilizarse de acuerdo con los métodos y usos de la invención. Así, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse ex vivo o in vivo a un sujeto con el fin de poner en práctica los métodos de tratamiento y usos de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para que sean compatibles con el método o la vía de administración previstos; se establecen en este documento rutas ejemplares de administración. Además, las composiciones farmacéuticas pueden comprender además otros agentes o compuestos terapéuticamente activos que se describen en el presente documento (por ejemplo, agentes reductores de la glucosa) o conocidos por los expertos en la técnica que pueden utilizarse en el tratamiento o la prevención de enfermedades y trastornos, tal como se establece en el presente documento.

- Las composiciones farmacéuticas suelen comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una de las secuencias peptídicas de la invención y uno o más agentes de formulación farmacéutica y fisiológicamente aceptables. Los diluyentes, vehículos o excipientes farmacéutica y fisiológicamente aceptables, incluyen, entre otros, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico y bisulfato sódico), conservantes (p. ej., alcohol bencílico, parabenos de metilo, etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato), agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes dispersantes, disolventes, rellenos, agentes de carga, tampones, vehículos, diluyentes y/o adyuvantes. Por ejemplo, un vehículo adecuado puede ser una solución salina fisiológica o solución salina tamponada de citrato, posiblemente complementada con otros materiales comunes en composiciones farmacéuticas para la administración parenteral. Una solución salina neutra o salina mezclada con albúmina sérica son otros vehículos ejemplares. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de tampones que pueden ser utilizados en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación utilizadas en la invención. Los tampones típicos incluyen, entre otros, ácidos débiles farmacéuticamente aceptables, bases débiles o mezclas de los mismos. Los componentes tampón también incluyen materiales solubles en agua tales como ácido fosfórico, ácidos tartáricos, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido glutámico y sales de los mismos.
- Un disolvente primario en un vehículo puede ser acuoso o no acuoso en la naturaleza. Además, el vehículo puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables para modificar o mantener el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la esterilidad o la estabilidad de la composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un tampón acuoso. En otras realizaciones, el vehículo comprende, por ejemplo, cloruro de sodio y/o citrato de sodio.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener otros agentes de formulación farmacéuticamente aceptables para modificar o mantener la velocidad de liberación del péptido de la invención. Estos agentes de formulación incluyen aquellas sustancias conocidas por los expertos en la técnica en la preparación de formulaciones de liberación sostenida. Para más referencias relativas a los agentes de formulación farmacéutica y fisiológicamente aceptables, véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) páginas 1435-1712, The Merck Index, 12ª Ed. (1996, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ); y Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.). Se conocen en la técnica otras composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración y son aplicables en los métodos y composiciones de la invención.
- Una composición farmacéutica puede almacenarse en un vial estéril como solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o polvo deshidratado o liofilizado. Tales composiciones pueden almacenarse en una forma lista para usar, una forma liofilizada que requiere reconstitución antes de su uso, una forma líquida que requiere dilución antes de su uso, u otras formas aceptables. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica en un recipiente de un solo uso (por ejemplo, un vial de un solo uso, ampolla, jeringa o autoinyector (similar a, p. ej., un EpiPen®)), mientras que en otras realizaciones se proporciona un recipiente multiusos (por ejemplo, un vial multiusos). Puede utilizarse cualquier aparato de administración de medicamentos para suministrar los péptidos de la invención, incluidos implantes (por ejemplo, bombas implantables) y sistemas de catéteres, ambos conocidos por los expertos en la técnica. Las inyecciones de depósitos, que generalmente se administran por vía subcutánea o intramuscular, también pueden ser utilizadas para liberar los péptidos de la invención durante un período de tiempo definido. Las inyecciones de depósitos son generalmente sólidas o están constituidas a base de aceites y generalmente comprenden al menos uno de los componentes de la formulación establecidos en este documento. Los expertos en la técnica están familiarizados con las posibles formulaciones y usos de las inyecciones de depósitos.
- Se puede formular una composición farmacéutica para que sea compatible con su vía de administración prevista. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas incluyen vehículos, diluyentes o excipientes adecuados para su administración por diferentes vías incluyendo la parenteral (p. ej., subcutánea (s.c.), intravenosa, intramuscular o intraperitoneal), intradérmica, oral (p. ej., ingestión), inhalación, intracavidad, intracraneal y transdérmica (tópica).
- Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una suspensión acuosa inyectable estéril u oleaginosa. Esta suspensión puede formularse utilizando agentes de dispersión o humectación adecuados y los agentes de suspensión descritos en este documento o conocidos por los expertos en la técnica. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable como, por ejemplo, una solución en 1,3-butano diol. Los diluyentes aceptables, disolventes y medios de dispersión que pueden emplearse incluyen agua, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro sódico, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada de fosfato (PBS), etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos. Además, se emplean aceites estériles y fijos convencionalmente como disolventes o medios de suspensión. Para ello, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluidos los mono- o di-glicéridos sintéticos. Por otra parte, ácidos grasos como el ácido oleico encuentran también un uso en la preparación de los inyectables. La absorción prolongada de formulaciones inyectables particulares se puede lograr mediante la inclusión de un agente que retrasa la absorción (por ejemplo, monostearato de aluminio o gelatina).
- Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas, píldoras, pastillas, suspensiones acuosas o aceitosas, polvos o gránulos dispersables,

emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes, soluciones, microperlas o elixires. Las composiciones farmacéuticas destinadas a un uso oral podrán prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas. Tales composiciones pueden contener uno o más agentes, tales como agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables. Los comprimidos que contienen el péptido de la invención pueden estar en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes incluyen, por ejemplo, diluyentes, como el carbonato de calcio, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes granuladores y desintegradores, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes de unión, por ejemplo almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Los comprimidos, cápsulas y similares adecuados para la administración oral pueden estar sin recubrimiento o pueden haber sido recubiertos con técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y así proporcionar una acción mantenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo temporal, tal como el monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También pueden ser recubiertos por técnicas conocidas en la técnica para formar tabletas terapéuticas osmóticas para su liberación controlada. Otros agentes incluyen partículas biodegradables o biocompatibles o sustancias poliméricas como poliésteres, ácidos de poliamina, hidrogeles, polivinil-pirrolidona, polianhidruros, ácido poliglicólico, etilvinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina o copolímeros de lactida/glicólico, copolímeros de polilactida/glicólico o copolímeros de etilvinilacetato para controlar la administración de una composición administrada. Por ejemplo, el agente oral puede ser atrapado en microcápsulas preparadas por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, mediante el uso de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina o microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, o en un sistema de administración de fármacos coloidales. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, microperlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Los métodos de preparación de tales formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente.

También pueden presentarse formulaciones para su uso oral como las cápsulas de gelatina dura, en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato cálcico, caolín o celulosa microcristalina, o como cápsulas de gelatina blanda en el que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio de aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con los excipientes adecuados para la fabricación de los mismos. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinil-pirrolidona, goma de tragacanto y acacia; agentes dispersantes o humectantes pueden ser una fosfatida de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileño con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxi-etileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxiacetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como el monooleato de polioxietileno-sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, el monooleato de polietileno-sorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes.

Las suspensiones aceitosas pueden formularse suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como la parafina líquida. Las suspensiones aceitosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden agregar agentes edulcorantes como los establecidos anteriormente, y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral aceptable.

Los polvos dispersables y gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en la mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Se ilustran en el presente documento agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de maní, o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma de acacia o goma de tragacanto; fosfatidas naturales, por ejemplo, soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos; anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitan; y productos de condensación de ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietileno-sorbitan.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir vehículos para proteger la composición contra la degradación rápida o eliminación en el cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, liposomas, hidrogeles, profármacos y sistemas de administración microencapsulados. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo temporal como el monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo solo, o en

combinación con una cera. La absorción prolongada de las composiciones farmacéuticas inyectables se puede lograr mediante la inclusión de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio o la gelatina. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares.

- 5 También se describen en este documento péptidos de la invención en forma de supositorios para la administración rectal. Los supositorios se pueden preparar mezclando un péptido de la invención con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas normales pero líquido a la temperatura rectal y que, por lo tanto, se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen, entre otros, manteca de cacao y polietilenglicol.
- 10 Se describen en el presente documento métodos de identificación de péptidos (o una subsecuencia, variante o forma modificada como se establece en el presente documento) que tienen cierta actividad de reducción de glucosa sin mostrar una actividad sustancial de carcinoma hepatocelular (HCC). En un caso, el método incluye: cribar (por ejemplo, ensayando o midiendo) una secuencia peptídica (o una subsecuencia, variante o forma modificada como se establece en el presente documento) para determinar la actividad de reducción de glucosa; y cribar (por ejemplo,
- 15 ensayando o midiendo) una secuencia peptídica (o una subsecuencia, variante o forma modificada como se establece en el presente documento) para determinar la actividad de HCC, o la expresión de un marcador que se correlaciona con la actividad del HCC. Un péptido con actividad de reducción de glucosa y actividad de HCC reducida o ausente identifica, así, al péptido. En un caso particular, el marcador que se correlaciona con la actividad de HCC comprende el perfil lipídico, un péptido que tiene menos actividad de aumento de lípidos en comparación
- 20 con FGF19 indica que el péptido tiene menos actividad del CCH o carece de ésta; o el marcador que se correlaciona con la actividad del CCH comprende la expresión génica de aldo-ceto reductasa, un péptido que regula a la baja o disminuye la expresión génica de la aldo-ceto reductasa en comparación con FGF19, indica que el péptido tiene menos actividad del CCH o carece de ésta; o el marcador indicativo de la actividad de hCC comprende la expresión génica de Slc1a2- un péptido que regula al alza o aumenta la expresión génica de Slc1a2 en comparación con
- 25 FGF19 indica que el péptido tiene menos actividad de HCC o carece de ésta.

- Los términos "ensayar" y "medir" y sus variaciones gramaticales se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a determinaciones cualitativas o cuantitativas, o tanto a determinaciones cualitativas como cuantitativas. Cuando los términos se utilizan con referencia a la detección, se contempla cualquier medio para
- 30 evaluar la cantidad relativa, incluyendo los diversos métodos establecidos en este documento y conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión génica puede ser ensayada o medida por una transferencia Northern, transferencia Western, un ensayo de inmunoprecipitación o mediante la medición de la actividad, función o cantidad de la proteína expresada (por ejemplo, aldo-ceto reductasa o Slc1a2).

- Los factores de riesgo de HCC, el tipo más común de cáncer de hígado, incluyen la diabetes tipo 2 (probablemente exacerbada por la obesidad). El riesgo de HCC en diabéticos de tipo 2 es mayor (de ~2,5 a ~7 veces el riesgo no
- 35 diabético) dependiendo de la duración de la diabetes y el protocolo de tratamiento.

- Se pueden utilizar diversas metodologías en el cribado y diagnóstico de HCC y son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los indicadores para HCC incluyen la detección de un marcador de tumores como los niveles elevados de alfafetoproteína (AFP) o des-gamma carboxiprotrombina (DCP). Una serie de diferentes técnicas de exploración e imágenes también son útiles, incluyendo ultrasonido, tomografía computarizada y RMN. En relación
- 40 con la invención, la evaluación de si un péptido (por ejemplo, un péptido candidato) presenta alguna evidencia de inducir HCC puede determinarse in vivo mediante, por ejemplo, la cuantificación de la formación de nódulos HCC en un modelo animal, como ratones db/db, un péptido administrado, en comparación con la formación de nódulos HCC por el FGF19 natural. Macroscópicamente, el cáncer de hígado puede ser nodular, donde los nódulos tumorales (que son de redondos a ovalados, grises o verdes, bien circunscritos pero no encapsulados) aparecen como una
 - 45 masa grande o múltiples masas más pequeñas. Alternativamente, HCC puede estar presente como un tumor infiltrado que es difuso y mal circunscrito y que se infiltra con frecuencia en las venas del porta.

- La evaluación patológica de las muestras de tejido hepático generalmente se realiza después de que los resultados de una o más de las mencionadas técnicas indiquen si es probable la presencia de HCC. Por lo tanto, los métodos que se describen en el presente documento pueden incluir además la evaluación de una muestra de tejido hepático
- 50 a partir de un modelo animal in vivo (por ejemplo, un ratón db/db) útil en estudios de HCC para determinar si una secuencia peptídica exhibe evidencias de inducción de HCC. Mediante la evaluación microscópica, un patólogo puede determinar si uno de los cuatro tipos arquitectónicos y citológicos generales (patrones) del HCC están presentes (es decir, como fibroláminas, pseudoglandular (adenoides), pleomórfico (célula gigante) y células claras).

- También se describe en este documento la generación y el uso de anticuerpos, y fragmentos de los mismos, que unen las secuencias peptídicas de la invención, incluyendo subsecuencias, variantes de secuencia y formas modificadas de las secuencias peptídicas ejemplificados (incluyendo los péptidos mencionados en las Tablas 1-8 y la Figura 1).
- 55

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) se refieren a las glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan

especificidad de unión a un antígeno, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que pueden carecer de especificidad antigénica.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de unión a anticuerpos, incluidos Fab y F(ab')₂, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. La unidad estructural de anticuerpos básicos comprende un tetrámero, y cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par tiene una cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-70 kDa). La parte aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principales responsables del reconocimiento de antígenos. Por el contrario, la parte carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda, mientras que las cadenas pesadas humanas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgA e IgE, respectivamente. Los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de los anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena única.

Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de unos 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de unos 10 aminoácidos más. Todas las cadenas de anticuerpos presentan la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, lo que permite el enlace a un epítipo específico. Del extremo N-terminal al extremo C-terminal, las cadenas ligeras y pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

Un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión y, excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos por una variedad de métodos incluyendo la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno.

Un "anticuerpo neutralizante" es una molécula de anticuerpos que es capaz de eliminar o reducir significativamente una función efector de un antígeno objetivo al que se une.

Los fragmentos de unión de anticuerpos pueden ser producidos por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. La digestión de anticuerpos con la enzima papaína da como resultado dos fragmentos idénticos de unión a antígenos, también conocidos como fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" que no tiene actividad de unión a antígenos. La digestión de anticuerpos con la enzima pepsina da como resultado un fragmento de F(ab')₂ en el que los dos brazos de la molécula del anticuerpo permanecen unidos y comprenden sitios de unión de dos antígenos. El fragmento F(ab')₂ tiene la capacidad de reticular al antígeno.

El término "Fab" se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. El término "Fv", cuando se utiliza en este documento, se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que conserva los sitios de reconocimiento de antígenos y de unión a antígenos. En una especie de Fv de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación no covalente. En una especie de Fv de una sola cadena, un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera puede estar unido covalentemente por un enlazante de péptido flexible de tal manera que las cadenas ligeras y pesadas puedan asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas. Es, en esta configuración, que los tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de enlace a antígenos en la superficie del dímero VH-VL. Mientras que los seis CDR, colectivamente, confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo, incluso un único dominio variable (o el resto de un Fv que comprende sólo tres CDR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir el antígeno.

La expresión "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" se refiere a partes de receptores inmunológicos que hacen contacto con un ligando específico y determinan su especificidad. La expresión "región

hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" y/o esos restos de un "bucle hipervariable".

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a los sitios de unión de anticuerpos contra antígenos proteicos. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, así como características estructurales y de carga tridimensionales específicas. Se dice que un anticuerpo une un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, y más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$. Una constante de equilibrio mayor (" K_D ") significa que hay menos afinidad entre el epítipo y el anticuerpo, mientras que una constante de equilibrio menor significa que hay una mayor afinidad entre el epítipo y el anticuerpo. Un anticuerpo con una K_D de "no más de" una cierta cantidad significa que el anticuerpo se unirá al epítipo con la K_D dada o más fuertemente. Mientras que la K_D describe las características de unión de un epítipo y un anticuerpo, la "potencia" describe la eficacia del propio anticuerpo para una función del anticuerpo. No hay necesariamente una correlación entre una constante de equilibrio y la potencia; por lo tanto, por ejemplo, una K_D relativamente baja no significa automáticamente una alta potencia.

El término "se une selectivamente" en referencia a un anticuerpo no significa que el anticuerpo sólo se una a una sola sustancia, sino que la K_D del anticuerpo respecto a una primera sustancia es menor que la K_D del anticuerpo a una segunda sustancia. Un anticuerpo que se une exclusivamente a un epítipo sólo se une a ese único epítipo.

Cuando se administran a seres humanos, los anticuerpos que contienen las regiones variables y/o constantes de roedores (murinos o ratas) a veces se asocian, por ejemplo, con el aclaramiento rápido del cuerpo o la generación de una respuesta inmunitaria por parte del cuerpo contra el anticuerpo. Con el fin de evitar la utilización de anticuerpos derivados de roedores, se pueden generar anticuerpos totalmente humanos a través de la introducción de la función de anticuerpos humanos en un roedor para que el roedor produzca anticuerpos completamente humanos. A menos que se identifique específicamente en este documento, los anticuerpos "humanos" y "completamente humanos" se pueden utilizar indistintamente en este documento. La expresión "completamente humano" puede ser útil al distinguir anticuerpos que son sólo parcialmente humanos de los que son completamente, o totalmente humanos. El experto en la técnica conoce los diversos métodos de generación de anticuerpos completamente humanos que existen.

Con el fin de abordar posibles respuestas de anticuerpos anti-ratón humanos, se pueden utilizar anticuerpos quiméricos o humanizados de otro modo. Los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murina, y, como tal, se pueden observar respuestas de anticuerpos anti-quiméricos humanos en algunos pacientes. Por lo tanto, es ventajoso proporcionar anticuerpos completamente humanos contra enzimas multiméricas con el fin de evitar posibles respuestas de anticuerpos anti-ratón humanos o humanos anti-quiméricos.

Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos se pueden preparar, por ejemplo, mediante la generación de líneas celulares de hibridomas mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Otros métodos de preparación implican el uso de secuencias que codifican anticuerpos particulares para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada, tal como una célula CHO. La transformación puede ser por cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son frecuentes en la técnica e incluyen la transfección mediada por dextrano, la precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por polibromo, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido o de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos. Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son frecuentes en la técnica e incluyen, entre otras las células CHO, células HeLa, y células de carcinoma hepatocelular humano.

Se pueden utilizar anticuerpos de forma diagnóstica y/o terapéutica. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos como diagnóstico detectando el nivel de uno o más péptidos de la invención en un sujeto, y comparando el nivel detectado con el nivel de control estándar o con un nivel de referencia en un sujeto determinado previamente (por ejemplo, antes de cualquier enfermedad). Se pueden utilizar anticuerpos como agentes terapéuticos para modular la actividad de uno o más péptidos de la invención, teniendo así un efecto sobre la condición o el trastorno.

En el presente documento se describen kits que incluyen, entre otros, secuencias peptídicas de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más agentes terapéuticos, composiciones y composiciones farmacéuticas de los mismos, empaquetados en un material de embalaje adecuado. Un kit incluye opcionalmente una etiqueta o un prospecto que incluye una descripción de los componentes o instrucciones de su uso in vitro, in vivo o ex vivo, de los componentes dentro del mismo. Unas instrucciones ejemplares incluyen instrucciones para disminuir o reducir la glucosa en sangre, un tratamiento para la hiperglucemia, un tratamiento para la diabetes, etc.

Los kits pueden contener un conjunto de estos componentes, por ejemplo, dos o más secuencias peptídicas solas, o una combinación de una secuencia peptídica con otra composición terapéuticamente útil (por ejemplo, un medicamento antidiabético, como un compuesto de gastrina).

La expresión "material de embalaje" se refiere a una estructura física que alberga los componentes del kit. El material de embalaje puede mantener los componentes de forma estéril, y puede estar hecho de algún material comúnmente utilizado para tales fines (por ejemplo, papel, cartón, vidrio, plástico, papel, ampollas, viales, tubos, etc.).

- 5 Los kits pueden incluir etiquetas o prospectos. Las etiquetas o los prospectos incluyen una "hoja impresa", por ejemplo, de papel o cartón, separada o colocada en un componente, un kit o material de embalaje (por ejemplo, una caja), o pueden estar unidos, por ejemplo, a una ampolla, tubo o vial que contiene un componente del kit. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir además un medio legible por ordenador, tal como un disco (por ejemplo, disco duro, tarjeta, disco de memoria), disco óptico como CD o DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, cinta magnética o un
- 10 medio de almacenamiento eléctrico como RAM y ROM o híbridos de estos, como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos, medios FLASH o tarjetas de memoria.

Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información de identificación de alguno o más componentes en el mismo, cantidades de dosis, farmacología clínica del(los) ingrediente(s) activo(s), incluido el mecanismo de acción, la farmacocinética y la farmacodinámica. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información que identifique la

15 información del fabricante, los números de lote, la ubicación del fabricante y la fecha.

Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información sobre una afección, trastorno, enfermedad o síntoma para el que se puede utilizar un componente del kit. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir instrucciones para el médico o para un sujeto para el uso de uno o más de los componentes del kit en un método, protocolo de tratamiento o régimen terapéutico. Las instrucciones pueden incluir cantidades de dosificación, frecuencia o

20 duración, e instrucciones para poner en práctica cualquiera de los métodos, protocolos de tratamiento o regímenes terapéuticos establecidos en este documento. Las instrucciones ejemplares incluyen instrucciones para el tratamiento o el uso de una secuencia peptídica como se establece en este documento. Por lo tanto, los kits también pueden incluir marcadores o instrucciones para poner en práctica cualquiera de los métodos y usos de la invención descritos en el presente documento, incluidos los métodos y usos de tratamiento.

Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información sobre cualquier beneficio que un componente pueda proporcionar, tal como un beneficio profiláctico o terapéutico. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información sobre posibles efectos adversos, tales como advertencias al sujeto o al médico con respecto a situaciones en las que no sería apropiado utilizar una composición en particular. También podrían ocurrir efectos secundarios adversos cuando el sujeto tenga que tomar, tomará en un futuro o esté tomando en la actualidad uno o

30 más medicamentos que puedan ser incompatibles con la composición, o cuando el sujeto tenga que tomar, tomará en un futuro o esté tomando en la actualidad otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico que sería incompatible con la composición y, por lo tanto, las instrucciones podrían incluir información sobre tales incompatibilidades.

Los kits también pueden incluir otros componentes. Cada componente del kit se puede incluir dentro de un recipiente individual y todos los recipientes pueden estar dentro de un solo paquete. Los kits se pueden diseñar para el almacenamiento en frío. Los kits también pueden ser diseñados para contener secuencias peptídicas de la invención, o contener ácidos nucleicos que codifiquen secuencias peptídicas. Las células del kit se pueden mantener en condiciones de almacenamiento adecuadas hasta que estén listas para su uso.

35

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por los expertos ordinarios en la técnica al que pertenece esta invención. Aunque se puedan utilizar en la práctica o ensayo de la invención métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen los métodos y materiales adecuados.

40

Tal como se utiliza en el presente documento, las formas singulares "un/uno/una", y "el/la" incluyen sus referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una secuencia peptídica" o a un "tratamiento" incluye a la pluralidad de tales secuencias, tratamientos, etc.

45

Tal como se utiliza en este documento, los valores numéricos se presentan a menudo en un formato de intervalos a lo largo de este documento. El uso de un formato de intervalos es simplemente para mayor comodidad y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En consecuencia, el uso de intervalos incluye expresamente todos los subintervalos posibles, todos los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo, y todos los valores numéricos o intervalos numéricos, incluidos los números enteros dentro de dichos intervalos y fracciones de los valores o los números enteros dentro de intervalos a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Esta construcción se aplica independientemente de la amplitud del intervalo y en todos los contextos a lo largo de este documento de patente.

50 Así, por ejemplo, la referencia a un intervalo de 90-100% incluye 91-99%, 92-98%, 93-95%, 91-98%, 91-97%, 91-96%, 91-95%, 91-94%, 91-93%, y así sucesivamente. La referencia a un intervalo de 90-100% también incluye 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, etc., así como 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5%, etc., 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5%, etc.

55

Además, la referencia a un intervalo de 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250 incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. En otro ejemplo, la referencia a un intervalo de 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 o 2500-5000, 5000-25,000, 5000-50,000 incluye cualquier valor numérico o intervalo dentro o que abarca tales valores, por ejemplo, 25, 26, 27, 28, 29...250, 251, 252, 253, 254....500, 501, 502, 503, 504..., etc.

Como también se utiliza en este documento, una serie de intervalos se describen a lo largo de este documento. El uso de una serie de intervalos incluye combinaciones de los intervalos superior e inferior para proporcionar otro intervalo. Esta construcción se aplica independientemente de la amplitud del intervalo y en todos los contextos a lo largo de este documento de patente. Así, por ejemplo, la referencia a una serie de intervalos como 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-75, 75-100, 100-150, incluye intervalos como 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-75, 5-100, 5-150 y 10-30, 10-40, 10-50, 10-75, 10-100, 10-150 y 20-40, 20-50, 20-75, 20-100, 20-150, y así sucesivamente.

En aras de la concisión, ciertas abreviaturas se utilizan en este documento. Un ejemplo es la abreviatura de una sola letra para representar restos de aminoácidos. Los aminoácidos y sus correspondientes tres letras y abreviaturas de tres letras son los siguientes:

• alanina	Ala	(A)
• arginina	Arg	(R)
• asparagina	Asn	(N)
• ácido aspártico	Asp	(D)
• cisteína	Cys	(C)
• ácido glutámico	Glu	(E)
• glutamina	Gln	(Q)
• glicina	Gly	(G)
• histidina	His	(H)
• isoleucina	Ile	(I)
• leucina	Leu	(L)
• lisina	Lys	(K)
• metionina	Met	(M)
• fenilalanina	Phe	(F)
• prolina	Pro	(P)
• serina	Ser	(S)
• treonina	Thr	(T)
• triptófano	Trp	(W)
• tirosina	Tyr	(Y)
• valina	Val	(V)

Se han descrito varias realizaciones de la invención. Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, pero sin limitar, el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

La siguiente es una descripción de varios métodos y materiales utilizados en los estudios en este documento.

Animales. Fueron comprados ratones db/db en the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones se mantuvieron de acuerdo con las pautas de bienestar bajo condiciones controladas de luz (ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, oscuridad 6:30 pm-6:30 am), temperatura ($22\pm4^{\circ}\text{C}$) y humedad (de 50% a 20%). Tenían libre acceso al agua (agua destilada en autoclave) y se les alimentaba ad libitum con una dieta comercial (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, Irradiated 2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet) que contenía 17% de kcal en grasas, 23% de kcal en proteínas y 60% de kcal en carbohidratos. Para la obesidad inducida por la dieta, los ratones C57BL6/J (Laboratorio Jackson) se mantuvieron con una dieta alta en grasas (D12492, Dieta de investigación, New Brunswick, NJ, EE.UU.) que contenía 60% de kcal en grasas, 20% de kcal en proteínas y 20% de kcal en carbohidratos durante 16-20 semanas. Todos los estudios en animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de NGM.

Secuencias de ADN y aminoácidos. El ADNc de ORF codifica las variantes de FGF19 humano (FGF19 de Homo sapiens, N°. de entrada del GenBank NM_005117.2)

Secuencia de proteínas codificada por la PCR del ADNc (N°. de entrada del GenBank NP 005108.1). Se amplificó ORF de FGF19 con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN recombinante (ADNc) preparado a partir de tejido humano del intestino delgado. Se compraron kits de reactivos de la PCR con ADN polimerasa de Phusion de alta fidelidad en New England BioLabs (F-530L, Ipswich, MA). Se utilizaron los siguientes cebadores: cebador de PCR directo: 5' CCGACTAGTCACCatgaggagggtgtgtgg y cebador de PCR inverso: ATAAGAATGCGGCCGCTTACTTCTCAAAGCTGGGACTCCTC.

El fragmento de ADN amplificado se digirió con las enzimas de restricción Spe I y Not I (los sitios de restricción se incluyeron en los cebadores de la PCR de 5' o 3', respectivamente) y luego se unieron con vectores transgénicos AAV que habían sido digeridos con las mismas enzimas de restricción. El vector utilizado para la expresión contenía un marcador seleccionable y un casete de expresión compuesto por un fuerte promotor eucariota 5' de un sitio para la inserción de la secuencia de codificación clonada, seguido de una región no traducida de 3' y la cola de poliadelación de la hormona de crecimiento bovino. La construcción de la expresión también está flanqueada por repeticiones de terminales internos en los extremos de 5' y 3'.

Producción y purificación de AAV. Las células AAV293 (obtenidas de Agilent Technologies, Santa Clara, CA) se cultivaron en la Modificación del Medio Eagle de Dulbecco (DMEM, Mediatech, Inc. Manassas, VA) complementadas con suero de bovino fetal al 10% y 1 x solución antibiótica-antimicótica (Mediatech, Inc. Manassas, VA). Las células fueron coladas en placas a una densidad del 50% el día 1 en placas de cultivo celular de 150 mm y fueron transfectadas el día 2, utilizando el método de precipitación de fosfato cálcico con los siguientes 3 plásmidos (20 µg/placa de cada uno): plásmido transgénico AAV, plásmidos pHelper (Tecnologías Agilent) y AAV2/9plasmid (Gao et al., J. Virol. 78:6381 (2004)). 48 horas después de la transfección, las células fueron raspadas de las placas, peletizadas por centrifugación a 3000xg y resuspendidas en tampón que contenía Tris 20 mM, pH 8,5, NaCl 100 mM y MgCl_2 1 mM. La suspensión se congeló en un baño de hielo seco con alcohol y luego se descongeló en un baño de agua a 37°C. Los ciclos de congelación y descongelación se repitieron tres veces; Se añadió benzenasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en 50 unidades/ml; se añadió desoxicolato a una concentración final del 0,25%. Después de una incubación a 37°C durante 30 minutos, los desechos celulares fueron peletizados por centrifugación a 5000 x g durante 20 minutos. Las partículas virales en el sobrenadante fueron purificadas utilizando un gradiente de iodixanal discontinuado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como se describió anteriormente (Zolotukhin S. et al (1999) Gene Ther. 6:973). El stock viral se concentró utilizando Vivaspin 20 (corte MW 100.000 Dalton, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Francia) y se volvió a suspender en solución salina con fosfato (PBS) con 10% de glicerol y se almacenó a -80°C. Para determinar el número de copias del genoma viral, se incubaron 2 µl de stock viral en 6 µl de solución que contenía 50 unidades/ml de Benzonasa, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl_2 10 mM y CaCl_2 10 mM a 37°C durante 30 minutos.

Posteriormente, se añadieron 15 µl de la solución que contenía 2 mg/ml de Proteinasa K, 0,5% de SDS y EDTA 25 mM y la mezcla se incubó durante 20 minutos más a 55°C para liberar el ADN viral. El ADN viral se limpió con un miniKit DNeasy (Qiagen, Valencia, CA) y se eluyó con 40 µl de agua. La copia del genoma viral (GC) se determinó mediante el uso de PCR cuantitativo.

El stock viral se diluyó con PBS a los GC/ml deseables. Se administró la solución de trabajo viral (200 µl) en ratones a través de la inyección en la vena de la cola.

Ensayo de glucosa en sangre. La glucosa en sangre en el recorte de la cola del ratón se midió utilizando tiras reactivas ACCU-CHEK Active leídas por el medidor ACCU-CHEK Active (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo del perfil de lípidos. Se recogió sangre entera de los recortes de la cola del ratón en tubos capilares lisos (BD Clay Adams SurePrep, Becton Dickinson y Co. Sparks, MD). El suero y las células sanguíneas se separaron centrifugando los tubos en un Autocrit Ultra 3 (Becton Dickinson and Co. Sparks, MD). Las muestras de suero se analizaron para determinar el perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total, HDL y no HDL) utilizando Integra 400 Clinical Analyzer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo del nivel de exposición sérico de FGF19/FGF21/variantes. Se recogió sangre entera (alrededor de 50 µl/ratón) de los recortes de la cola del ratón en tubos capilares lisos (BD Clay Adams SurePrep, Becton Dickinson y Co. Sparks, MD). El suero y las células sanguíneas se separaron centrifugando los tubos en un Autocrit Ultra 3 (Becton Dickinson and Co. Sparks, MD). Los niveles de exposición de FGF19, FGF21 y variante en suero se determinaron utilizando los kits de EIA (Biovendor) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo de carcinoma hepatocelular (HCC). La muestra hepática fue recuperada de ratones db/db 6 meses después de la inyección de AAV. La puntuación de HCC se registra como el número de nódulos HCC en la superficie de todo el hígado a partir de ratones inyectados por variantes dividido por el número de nódulos HCC de ratones inyectados con FGF19.

Ensayo de expresión de genes hepáticos. La muestra hepática fue recuperada y homogeneizada en el reactivo de Trizol (Invitrogen). El ARN total se extrajo siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue tratado con DNasa (Ambion) seguido de un análisis cuantitativo de RT-PCR utilizando cebadores y reactivos Taqman de Applied Biosystems. Los niveles relativos de ARNm de aldo-ceto reductasa y slc1a2 en el hígado se calcularon utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$.

Ensayos de unión y de actividad de FGFR4. Se realizaron un ELISA en fase sólida (unión) y un ensayo de fosforilación ERK utilizando proteínas recombinantes purificadas. El ensayo de unión de FGFR se llevó a cabo utilizando ELISA en fase sólida. En resumen, fue recubierta una placa de 96 pocillos con 2 µg/ml de anticuerpo anti-hFc y fue incubada con 1 µg/ml de FGFR1-hFc o FGFR4-hFc. La unión a las variantes de FGF19 en presencia de 1 µg/ml b-klotho soluble y 20 µg/ml de heparina fueron detectadas por anticuerpos biotinilados anti-FGF19 (0,2 µg/ml), seguido de la incubación de estreptavidina-HRP (100 ng/ml). Para el ensayo de activación de FGFR4, fueron estimuladas células Hep3B con variantes FGF19 durante 10 minutos a 37°C, luego fueron inmediatamente lisadas y analizadas para determinar la fosforilación ERK utilizando un kit disponible comercialmente de Cis-Bio.

Ejemplo 2

Lo siguiente es una descripción de los estudios que muestran la actividad de reducción de glucosa de varias variantes de secuencia de FGF19 y FGF21, y construcciones de fusión FGF19/FGF21.

La Figura 2 ilustra las construcciones de fusión ejemplares FGF19/FGF21, y los segmentos de cada uno de FGF19 y FGF21 presentes en los péptidos de fusión. Estos péptidos se analizaron para determinar la actividad de reducción de glucosa y los lípidos estadísticamente significativos que elevan o aumentan la actividad (Tablas 1-8 y Figura 1).

Se inyectaron a los ratones (db/db) un vector viral que expresaba FGF19, FGF21 o variantes, y se analizaron después de la inyección. La actividad de reducción de glucosa de cada secuencia está representada por un símbolo "+" (un símbolo "-" significa que no hubo actividad de reducción de glucosa, un símbolo "+/-" significa que las variantes conservaban alguna actividad mínima de reducción de glucosa); la actividad de elevación de lípidos está representada por un símbolo "+" (un símbolo "-" significa que no hubo ninguna actividad de elevación de lípidos, un símbolo "+/-" significa que las variantes conservaban alguna actividad mínima de elevación de lípidos, Figura 2).

Dos fusiones de FGF21 y FGF19, la variante denotada M5 y la variante 45 (M45), mostraron cierta actividad de reducción de glucosa y ausencia de actividad estadísticamente significativa en la elevación o aumento de los lípidos. Las variantes denotadas M1, M2 y M69, respectivamente (Figura 1, también mostraron alguna actividad de reducción de glucosa (Figuras 3B y 3C, Tabla 5). Los datos que comparan la actividad de reducción de glucosa M5, M1, M2 y M69 y la actividad de elevación o aumento de lípidos a FGF19 y FGF21 se ilustran en las figuras 3A-3C y 4A-4C.

Ejemplo 3

Lo siguiente es una descripción de los estudios que muestran que las variantes M5, M1, M2 y M69 no son tumorigénicas, según lo determinado por la formación de carcinoma hepatocelular (HCC), y que las variantes M5, M2 y M69 tampoco reducen el músculo magro y la masa grasa.

Se inyectaron animales (db/db) con vectores AAV que expresaban FGF19, FGF21, M5, M1, M2 o M69, o se inyectaron con solución salina, y se analizaron 6 meses después de la inyección. Los datos indican que las variantes M5, M1, M2 y M69 no inducían significativamente la formación (HCC) (Figuras 5A-5C).

Los animales (ratones db/db) también fueron inyectados con un vector viral que expresaba FGF19, FGF21, M5, M1, M2 o M69, o se inyectaron con solución salina, y se analizaron 6 meses después de la inyección para determinar el efecto de la masa magra y la masa grasa. Los datos indican que los péptidos M5, M2 y M69 no causaron una reducción estadísticamente significativa de la masa magra o la masa grasa, en contraste con FGF21, y que el péptido M1 reducía la masa magra (Figuras 6A-6C).

Ejemplo de referencia 4

Lo siguiente es un resumen de los datos de 25 péptidos más de la variante analizados para determinar la actividad de elevación de lípidos y la tumorigenesis. Los datos muestran claramente una correlación positiva entre la elevación de los lípidos y la tumorigenesis, según lo determinado por la formación del carcinoma hepatocelular (HCC) en ratones db/db.

- 5 Las Tablas 1 a 3 resumen los datos de 26 péptidos de la variante diferentes. Estos péptidos de la variante ilustrativos tienen la secuencia C-terminal de FGF19:

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALTVAIKGVHVSRYLCMGADGKM

QGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML

PMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK

- 10 en la porción C-terminal, por ejemplo, después de los restos de aminoácidos "TSG". En particular, los péptidos de la variante (7 en total, incluyendo M5) que no causaron una elevación estadísticamente significativa de los lípidos no inducían la formación de carcinoma hepatocelular (CCH). Por el contrario, todos los péptidos de la variante (17 en total) que causaron una elevación estadísticamente significativa de los lípidos también causaron la formación del carcinoma hepatocelular (HCC) en ratones. Estos datos indican que existe una fuerte correlación positiva entre la actividad de elevación de lípidos y la formación de carcinomas hepatocelulares (HCC). En consecuencia, la actividad de elevación de lípidos se puede utilizar como indicador y/o predictor de la formación de carcinomas hepatocelulares (HCC) en animales.

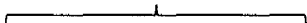
Tabla 1: Un alto nivel de triglicéridos y colesterol en ratones db/db parece correlacionarse de forma positiva con la formación de HCC.

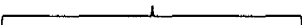
	Dominio N-terminal	Núcleo	Elevación de lípidos	Formación HCC
				
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
M74	R-----DAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M75	R-VHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M76	R-GDPI	RLRHLYTSG	-	-
M77	R-----	RLRHLYTSG	-	-
M78	R-----GPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M79	R-----GPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M80	R-----PHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M81	R-----HVHYGWGDPI	RLRHLYTSG		

Tabla 2: Un alto nivel de triglicéridos y colesterol en ratones db/db parece correlacionarse de forma positiva con la formación de HCC

	Dominio N-terminal	Núcleo	Elevación de lípidos	Formación HCC
				
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
M82	RPLAFSAAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+	+
M83	RPLAFSDAAPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+/-	+/
M84	RPLAFSDAGAHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+/-	+/
M85	RPLAFSDAGPHVHYGAGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M86	RPLAFSDAGPHVHYGWGAPI	RLRHLYTSG	+	+
M87	RPLAFSDAGPHVHYGWDAI	RLRHLYTSG	+	+

Tabla 3: Un alto nivel de triglicéridos y colesterol en ratones db/db parece correlacionarse de forma positiva con la formación de HCC

	Dominio N-terminal		Elevación de lípidos	Formación HCC
		Núcleo		
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
H31A/S141A(M88)		FGF19	+	+
H31A/H142A(M89)		FGF19	+	+
K127A/R129A(M90)		FGF19	+	+
K127A/S141A(M91)		FGF19	+	+
K127A/H142A(M92)		FGF19	+	+
R129A/S141A(M93)		FGF19	+	+
S141A/H142A(M94)		FGF19	+	+
K127A/H142A(M95)		FGF19	+	+
K127A/R129A/S141A(M97)		FGF19	+	+

	Dominio N-terminal		Elevación de lípidos	Formación HCC
		Núcleo		
	K127A/R129A/H142A(M98)	FGF19	+	+
	K127A/R129A/S141A/H142A(M99)	FGF19	+	+

Ejemplo 5

Lo siguiente es un resumen de los datos de otros péptidos de la variante FGF19 analizados para determinar la actividad de reducción de glucosa y la actividad de elevación de lípidos.

- 5 La Tabla 4 ilustra las "secuencias del núcleo" peptídicas de 35 variantes más de FGF19, denominadas de M5 a M40. Estos péptidos de las variantes ejemplificadas tienen la secuencia C-terminal FGF19,

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKM
 QGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML
 PMVPEEPEDLRGHLES DMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK

- 10 en la porción C-terminal, por ejemplo, después de los restos de aminoácidos "TSG" de la secuencia del núcleo. Los datos muestran claramente que las variantes M6, M7, M8, mM38 y M39 tienen las características deseadas de la actividad de reducción de glucosa y no tienen ninguna actividad de elevación de lípidos estadísticamente significativa en ratones db/db.

Tabla 4: Variantes adicionales y mapeo fino del dominio N-terminal

	Dominio N-terminal	Núcleo	Reducción de glucosa	Elevación de lípidos
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	+	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-
M6	R-----DSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-
M7	RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-
M8	R-HPIPDSSPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	+	-
M9	R-HPIPDSSPLLQFGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M10	R-HPIPDSSPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	-	+
M11	RPLAFSDAGPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M12	RPLAFSDAGPLLQFGWGDPI	RLRHLYTSG	-	+
M13	RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
M14	R-HPIPDSSPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	-	-

	Dominio N-terminal	Núcleo	Reducción glucosa	de	Elevación lípidos	de
M15	RPLAFSDAGPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	+		+	
M16	RPLAFSDAGPHVH--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M17	RPLAFSDAGPHV--GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M18	RPLAFSDAGPH--YGWGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M19	RPLAFSDAGP-V-YGWGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M20	RPLAFSDAGP-VH-GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M21	RPLAFSDAGP-VHY-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M22	RPLAFSDAGPHVH-GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M23	RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M24	RPLAFSDAGPH-HY-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M25	RPLAFSDAGPHV-Y-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M26	RPLAFSDSSPLVH--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M27	RPLAFSDSSPHVH--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M28	RPLAFSDAPHV---WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M29	RPLAFSDAGPHVHY-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M30	RPLAFSDAGPHVHYAWGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M31	R-HPIPDSSPLLQ--FGAQV	RLRHLYTSG	+/-		-	
M32	R-HPIPDSSPLLQ--FGIYQV	RLRHLYTSG	-		-	
M33	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-		-	
M34	R-HPIPDSSPLLQ--FG7AV	RLRHLYTSG	+/-		-	
M35	R-HPIPDSSPLLQ--FGGEV	RLRHLYTSG	+/-		+/	
M36	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+/-		-	
M37	R-HPIPDSSPLLQ--FGGUA	RLRHLYTSG	-		-	
M38	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQT	RLRHLYTSG	+		-	
M39	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQT	RLRHLYTSG	+		-	
M40	R-HPIPDSSPLLQFGWGQPO	RLRHLYTSG	-		+	

Tabla 4a:

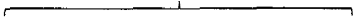
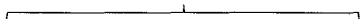
	Dominio N-terminal	Reducción de glucosa	Elevación de lípidos	Formación HCC
		Núcleo		
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	+	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD	+	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-
M9	R-HPIPDSSPLLQFGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M8	R-HPIPDSSPLLQ-WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M12	RPLAFSDAGPLLQFGWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M10	R-HPIPDSSPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M13	RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	-	+	+
M15	RPLAFSDAGPHVHYG--GQV RLRHLYTSG	-	-	+/-
M14	R-HPIPDSSPHVHYG--GQV RLRHLYTSG	-	-	+/-
M43	RPLAFSDAGPHVHYG-GD-IRLRHLYTSG	-	-	+/-
M6	R-----DSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-
M7	RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-

Tabla 4b:

	Dominio N-terminal	Reducción de glucosa	Elevación de lípidos	Formación HCC
		Núcleo		
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	+	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD	+	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-

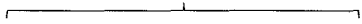
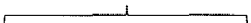
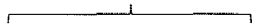
	Dominio N-terminal	Reducción de glucosa	Elevación de lípidos	Formación HCC
		Núcleo		
M31	R-HPIPDSSPLLQ--FGAQV RLRHLYTSG	+	-	+
M32	R-HPIPDSSPLLQ--FGDQV RLRHLYTSG	+	-	-
M33	R-HPIPDSSPLLQ-FGPQV RLRHLYTSG	-	-	+
M34	R-HPIPDSSPLLQ--FGGAV RLRHLYTSG	-	-	+
M35	R-HPIPDSSPLLQ-FGGEV RLRHLYTSG	-	-	+
M36	R-HPIPDSSPLLQ-FGGNV RLRHLYTSG	+	-	+/-
M37	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQA RLRHLYTSG	-	-	+
M38	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQI RLRHLYTSG	-	-	+
M39	R-HPIPDSSPLLQ-FGGQT RLRHLYTSG	-	-	+
M40	R-HPIPDSSPLLQFGWGQPV RLRHLYTSG	-	+	+

Tabla 4c:

	Dominio N-terminal	Reducción de glucosa	Elevación de lípidos	Formación HCC
		Núcleo		
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD	+	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-
M52	R-----DSSPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	-
M54	RPLAFSDAGPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M55	RPLAFSDAGPH--YGWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M56	RPLAFSDAGP-V-YGWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M57	RPLAFSDAGP-VH-GWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M58	RPLAFSDAGP-VHY-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M59	RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+

	Dominio N-terminal	Reducción de glucosa	Elevación de lípidos	Formación HCC
		Núcleo		
M60	RPLAFSDAGPH-HY-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M61	RPLAFSDAGPHV--GWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M62	RPLAFSDAGPHV-Y-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M63	RPLAFSDAGPHVH--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M64	RPLAFSDSSPLVH--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M65	RPLAFSDSSPHVH--WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M66	RPLAFSDAGPHLQ--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M67	RPLAFSDAGPHV---WGDPI RLRHLYTSG	-	-	+/-
M68	RPLAFSDAGPHVHY-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	-
M4	RPLAFSDAGPHVHYAWGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M69	R-----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	-
M70	MR-----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	-
M53	M-----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	-

La Tabla 5 ilustra las secuencias peptídicas de 3 variantes adicionales de FGF19, denominadas M1, M2 y M69. Los datos muestran claramente que estas tres variantes tienen las características deseadas de la actividad de reducción de glucosa en ratones db/db (Figuras 3B y 3C). Estas tres variantes parecen elevar los lípidos en ratones db/db (Figuras 4B y 4C).

5

Tabla 5: Otras variantes

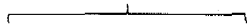
M1: RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSL LEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEK HRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMD PFGLVTGLEAVRSPSEK
M2: RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSL LEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEK HRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMD PFGLVTGLEAVRSPSEK
M69: RDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA VALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLP VLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGL VTGLEAVRSPSEK

Ejemplo 6

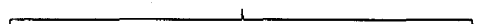
Lo siguiente es un resumen de datos que muestra que FGF19 reduce el peso corporal en ratones obesos inducidos por la dieta y en ratones ob/ob, y la actividad de formación de tumores hepáticos y el peso corporal en ratones db/db.

- 5 Se inyectaron a los ratones FGF19 o FGF21 en vector AAV. El peso corporal se registró 4 semanas después de la inyección.

Tabla 6: FGF19 reduce el peso corporal en ratones obesos inducidos por dieta y en ratones ob/ob

	Dominio N-terminal	<u>Bajada del peso corporal en DIO</u>	<u>Bajada del peso corporal en Ob/ob</u>
			
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD	+	+

- 10 Tabla 7: Correlación del peso corporal y la formación de tumores hepáticos de FGF19, FGF21 y variantes seleccionadas en ratones db/db

	Dominio N-terminal		<u>Nódulo de tumor hepático</u>	<u>Peso corporal</u>
		Núcleo		
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG		+	Aumentado
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD		-	Disminuido
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		-	Aumentado
M6	R----DSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		-	Disminuido
M32	R-HPIPDSSPLLQ-FGDQV RLRHLYTSG		-	Disminuido
M52	R----DSSPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG		-	Disminuido
M69	R----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG		-	Aumentado

Ejemplo 7

Lo siguiente es un estudio que muestra que los péptidos de la variante M5 y la variante M69 reducen la glucosa en sangre.

- 15 Se inyectaron a ratones (ob/ob) (por vía subcutánea) M5 (0,1 y 1 mg/kg, s.c.) o FGF19 (1 mg/kg, s.c.), o variante M69 (0,1 y 1 mg/kg, s.c.) o FGF19 (1 mg/kg, s.c.). Los niveles de glucosa plasmática se midieron a las 2, 4, 7 y 24 horas después de la inyección, y los resultados se muestran en la Figura 7. M5 (Figura 7A) y la variante M69 (Figura 7B) mostraron efectos similares de reducción de glucosa que el FGF19 natural.

Ejemplo 8

- 20 Este ejemplo describe un estudio que muestra que la expresión hepática de la familia aldo-ceto reductasa 1, miembro C18 (Akr1C18) y la familia del vehículo de soluto 1, miembro 2 (slc1a2) parece correlacionarse con la actividad del HCC.

A los ratones (db/db) se les inyectó el vector viral que expresaba FGF19 (HCC+), FGF21 (HCC-), dN2 (HCC-) o M5 (HCC-), o se les inyectó GFP. Las muestras hepáticas fueron recuperadas y analizadas por RT-PCR cuantitativo 2 semanas después de la inyección. Los datos, que se muestran en la Figura 8, muestran que la expresión hepática de Akr1C18 y slc1a2 parece correlacionarse con la actividad de HCC.

5 Tabla 8: Resumen de las variantes de FGF19 en el ensayo de señalización de adipocitos 3T3L1

Ensayo P-Erk en adipocitos 3T3L1	FGF19	FGF21	M5	M2	M63	M64	M1	M8
Experimento N°. 1:								
E _{max}	3,67	4,33	3,52	4,19	3,21	3,67	4,24	4,16
EC ₅₀ (nM)	0,05	0,65	0,03	0,05	0,92	0,02	0,03	0,03
Experimento N°. 2 :								
E _{max}	4,52	4,83	4,01	5,56	4,17	4,85	5,30	5,34
EC ₅₀ (nM)	0,33	1,48	0,14	0,15	0,66	0,12	0,09	0,09
Experimento N°. 3 :								
E _{max}	4,09	4,14	3,74	4,24	3,15	4,15	4,77	4,16
EC ₅₀ (nM)	0,16	1,50	0,24	0,14	0,28	0,14	0,07	0,14

REIVINDICACIONES

1. Un péptido quimérico que comprende o consiste en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:69, o SEQ ID NO:70.
2. El péptido quimérico de la reivindicación 1 que comprende o consiste en SEQ ID NO:2.
- 5 3. El péptido quimérico de la reivindicación 1 que comprende o consiste en SEQ ID NO:52.
4. El péptido quimérico de la reivindicación 1 que comprende o consiste en SEQ ID NO:53.
5. El péptido quimérico de la reivindicación 1 que comprende SEQ ID NO:70.
6. El péptido quimérico de la reivindicación 1 que consiste en SEQ ID NO:70.
7. El péptido quimérico de la reivindicación 1 que comprende SEQ ID NO:69.
- 10 8. El péptido quimérico de la reivindicación 1 que consiste en SEQ ID NO:69.
9. El péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho péptido se fusiona con una región de inmunoglobulina Fc.
10. Una composición farmacéutica que comprende el péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 15 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la composición farmacéutica comprende un agente reductor de glucosa.
12. Una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la molécula de ácido nucleico comprende además un elemento del control de la expresión en una unión operativa que confiere la expresión de la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido in vitro, en una célula o in vivo.
- 20 13. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 12.
14. El vector de la reivindicación 13, en el que el vector es un vector viral.
15. Una célula transformada o huésped que expresa el péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
16. Un péptido quimérico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método de mejora del metabolismo de la glucosa en un sujeto que lo necesite.
- 25 17. El péptido quimérico para su uso de la reivindicación 16, en el que el sujeto tiene una condición hiperglucémica, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico, obesidad, masa corporal indeseable, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), o aterosclerosis.
- 30 18. El péptido quimérico para su uso de la reivindicación 17, en el que la condición hiperglucémica comprende la diabetes.
19. El péptido quimérico para su uso de la reivindicación 18, en el que la diabetes es la diabetes dependiente de la insulina (tipo I), diabetes tipo II, diabetes gestacional o prediabetes.
20. El péptido quimérico para su uso de la reivindicación 16, en el que el sujeto:
 - (i) tiene un nivel de glucosa plasmática en ayunas (FPG) superior a 100 mg/dl;
 - 35 (ii) tiene un nivel de FPG superior a 125 mg/dl;
 - (iii) tiene un nivel de FPG de entre 100 y 125 mg/dl; o
 - (iv) tiene un nivel de hemoglobina A1c (HbA1c) superior al 6%.
- 40 21. Un péptido quimérico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método de tratamiento de un trastorno, en el que el trastorno es una condición hiperglucémica, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico, obesidad, masa corporal indeseable, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o aterosclerosis.
22. El péptido quimérico para su uso de la reivindicación 21, en el que la condición hiperglucémica comprende la diabetes.

23. El péptido quimérico para su uso de la reivindicación 22, en el que la diabetes es la diabetes dependiente de insulina (tipo I), diabetes tipo II, diabetes gestacional o prediabetes.
- 5 24. El péptido quimérico para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que el método resulta en una mayor sensibilidad a la insulina, disminución de la resistencia a la insulina, reducción del glucagón, tolerancia mejorada a la glucosa, mejora del metabolismo de la glucosa u homeostasis, mejora de la función pancreática, disminución del nivel de triglicéridos, reducción del nivel de colesterol, reducción del nivel de HDL, nivel reducido de LDL, reducción del nivel de VLDL, presión arterial reducida, reducción del engrosamiento intimal de los vasos sanguíneos, reducción de la masa corporal o aumento de peso, o reducción de los niveles de glucosa; en el que, opcionalmente, el nivel de glucosa se reduce en al menos un 5%.
- 10 25. El péptido quimérico para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que el método comprende además la administración de un tratamiento suplementario.
26. El péptido quimérico para su uso de la reivindicación 25, en el que dicha terapia suplementaria se administra antes, simultáneamente o después de la administración del péptido quimérico.
- 15 27. El péptido quimérico para su uso de la reivindicación 25 o 26, en el que el tratamiento complementario comprende:
- (a) una cirugía de pérdida de peso, bypass gástrico, gastrectomía, balón gástrico o manga gástrica; o
- (b) un agente reductor de glucosa, insulina, análogo de GLP1, biguanida, sulfonilurea, tiazolidindionas, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), una formulación de bromocriptina, un secuestrante del ácido biliar, metformina, una tiazolidindiona (TZD), un inhibidor de SGLT-2, o cualquier combinación de los mismos.
- 20 28. El péptido quimérico para su uso de la reivindicación 27(b), en el que:
- (i) dicha biguanida o sulfonilurea es tolbutamida, clorpropamida, acetohexamida, tolazamida, glibenclamida, glipizida o cualquier combinación de éstas;
- (ii) dicho tiazolidindiona es rosiglitazona o pioglitazona, o una combinación de éstas;
- (iii) dicho secuestrante de ácido biliar es colestevum; o
- 25 (iv) dicha insulina es insulina en bolo, insulina basal o un análogo de ésta.

FGF19

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEEDIRPDGYNVYRSEKH
RLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSEK

FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGS LHFDPACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA
S

M5

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA
LRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEEDIRPDGYNVYRSEKHRLPV
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVT
GLEAVRSPSEK

M71

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGS LHFDPACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA
S

M72

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGS LHFDPACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA
S

M73

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGS LHFDPACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVQDELQGVGG
EGCHMHPENCKTLLTDIDRTHTEKPVWDGITGE

M1

RPLAFSDASPHVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEEDIRPDGYNVYRSEKH
RLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSEK

FIG. 1

M2

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFRLIRADGVVDCARGQSAHSLEI
KAVARTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKH
RLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSFKE

M69

RDSSPLVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFRLIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA
LRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPV
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVT
GLEAVRSPSFKE

M3

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFRLIRADGVVDCARGQSAHSLEI
KAVARTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIIIILEDGYNVYRSEKH
LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
GLVTGLEAVRSPSFKE

M48

RDSSPLLQFGGQVRLRLHLYTSGPHGLSSCFRLIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVART
VAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGL
EAVRSPSFKE

M49

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRLHLYTSGPHGLSSCFRLIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA
VALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLP
VSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGL
VTGLEAVRSPSFKE

M50

RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRLHLYTSGPHGLSSCFRLIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIIIILEDGYNVYRSEKHRLPV
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLV
TGLEAVRSPSFKE

FIG. 1 (CONTINUACIÓN)

M51

RHPIPDSSPLLQFGGNRLRHLYTSGPHGLSSCF LRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
ALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPV
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLV
TGLEAVRSPSF EK

M52

RDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCF LRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV ALRT
VAIKGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGL
EAVRSPSF EK

M53

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCF LRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV ALRT
VAIKGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGL
EAVRSPSF EK

M70

MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCF LRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
ALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPV
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLV
TGLEAVRSPSF EK

FIG. 1 (CONTINUACIÓN)

<u>FGF21</u> (posición de aminoácidos)	<u>FGF21</u>	<u>FGF19</u>	<u>Reducción de glucosa</u>	<u>Elevación de lípidos</u>
1-181	FGF21	-	+	-
-	FGF19	1-194	+	+
1-16	M5	21-194	+	-
147-181	M41	1-147	+/-	+
1-16 & 147-181	M42	21-147	-	-
17-181	M44	1-20	+	+
1-146	M45	148-194	+	-
17-146	M46	1-20 & 148-194	+/-	-

FIG. 2

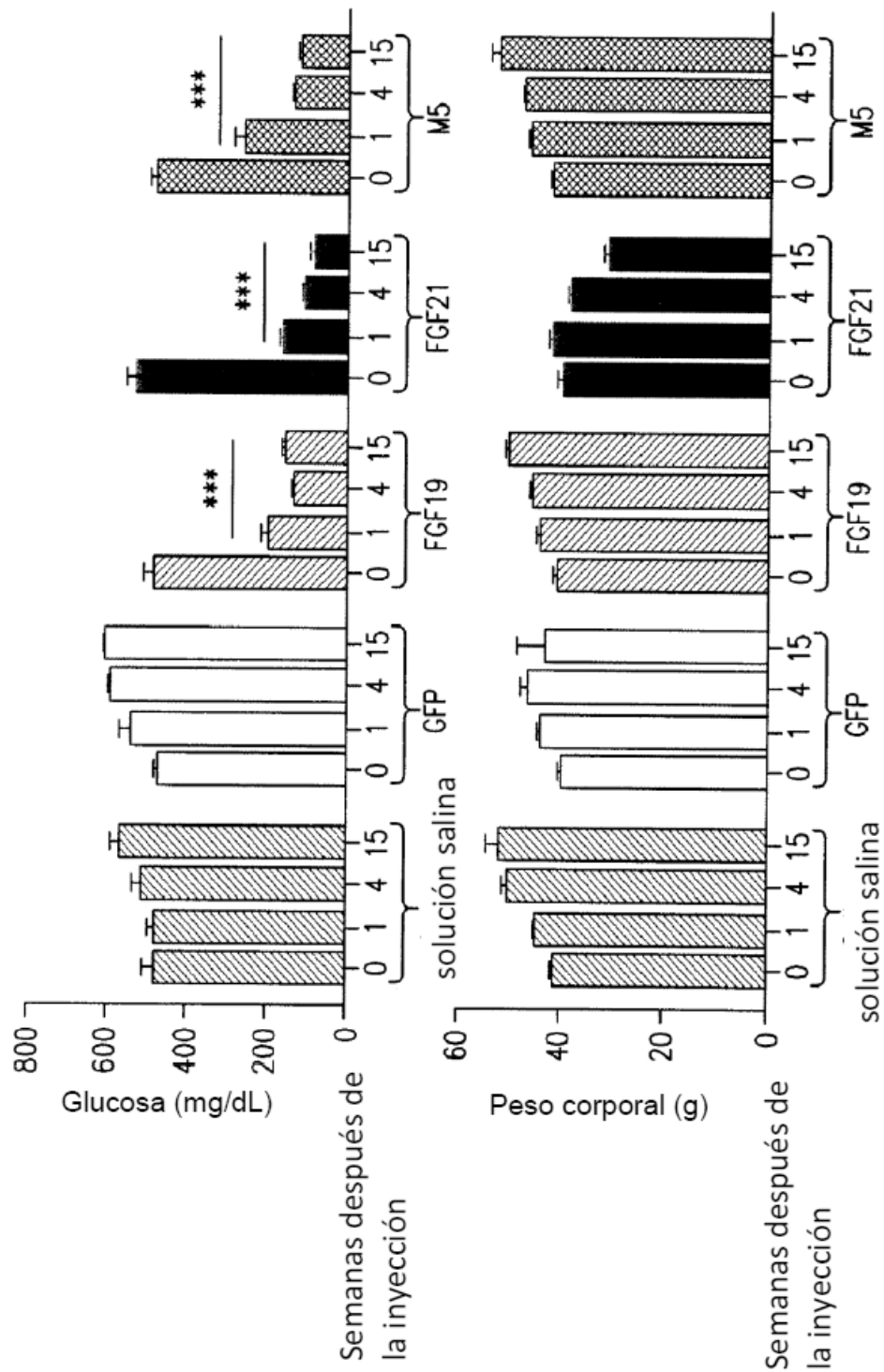


FIG. 3A (**P<0,001 vs. solución salina)

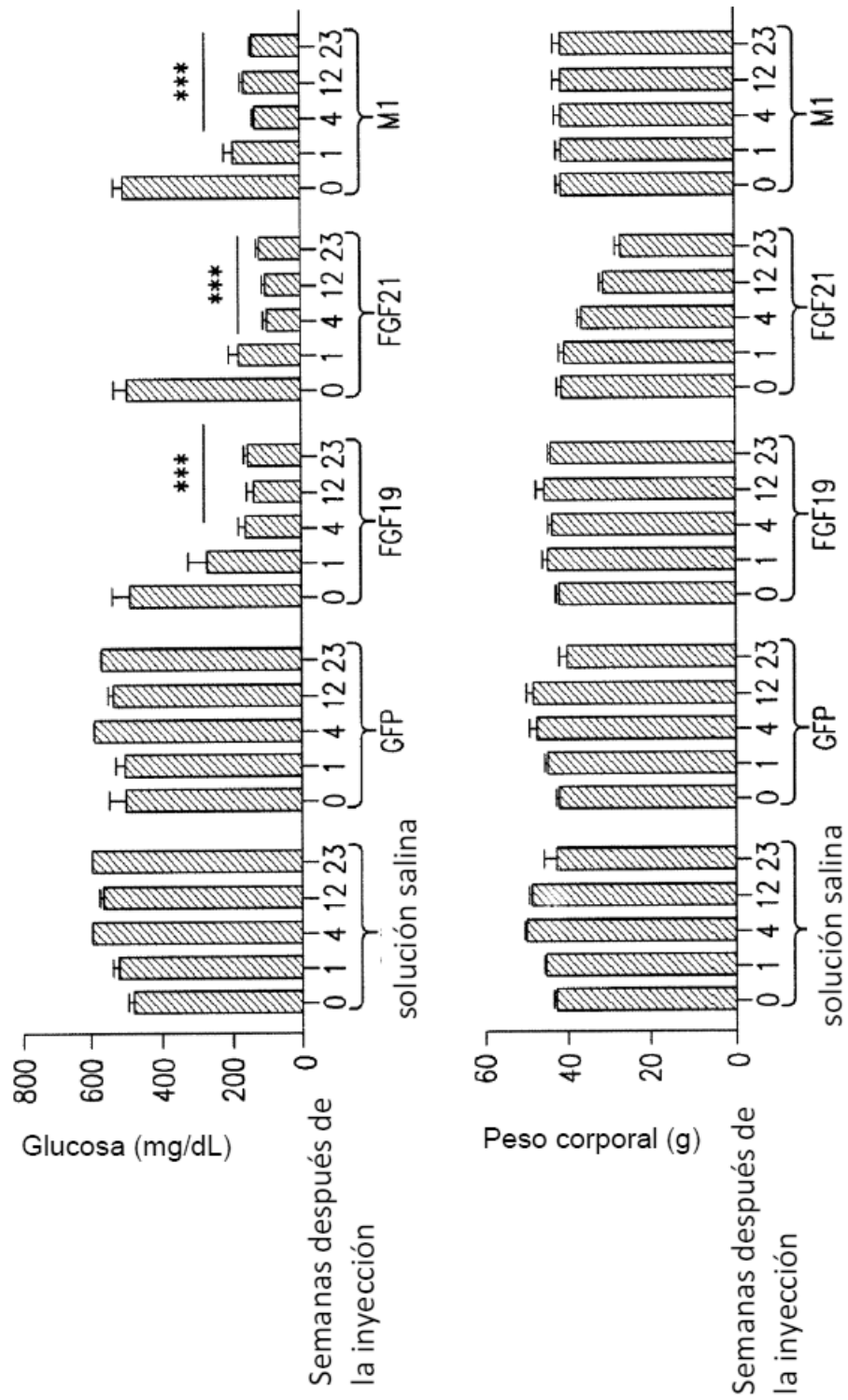


FIG. 3B

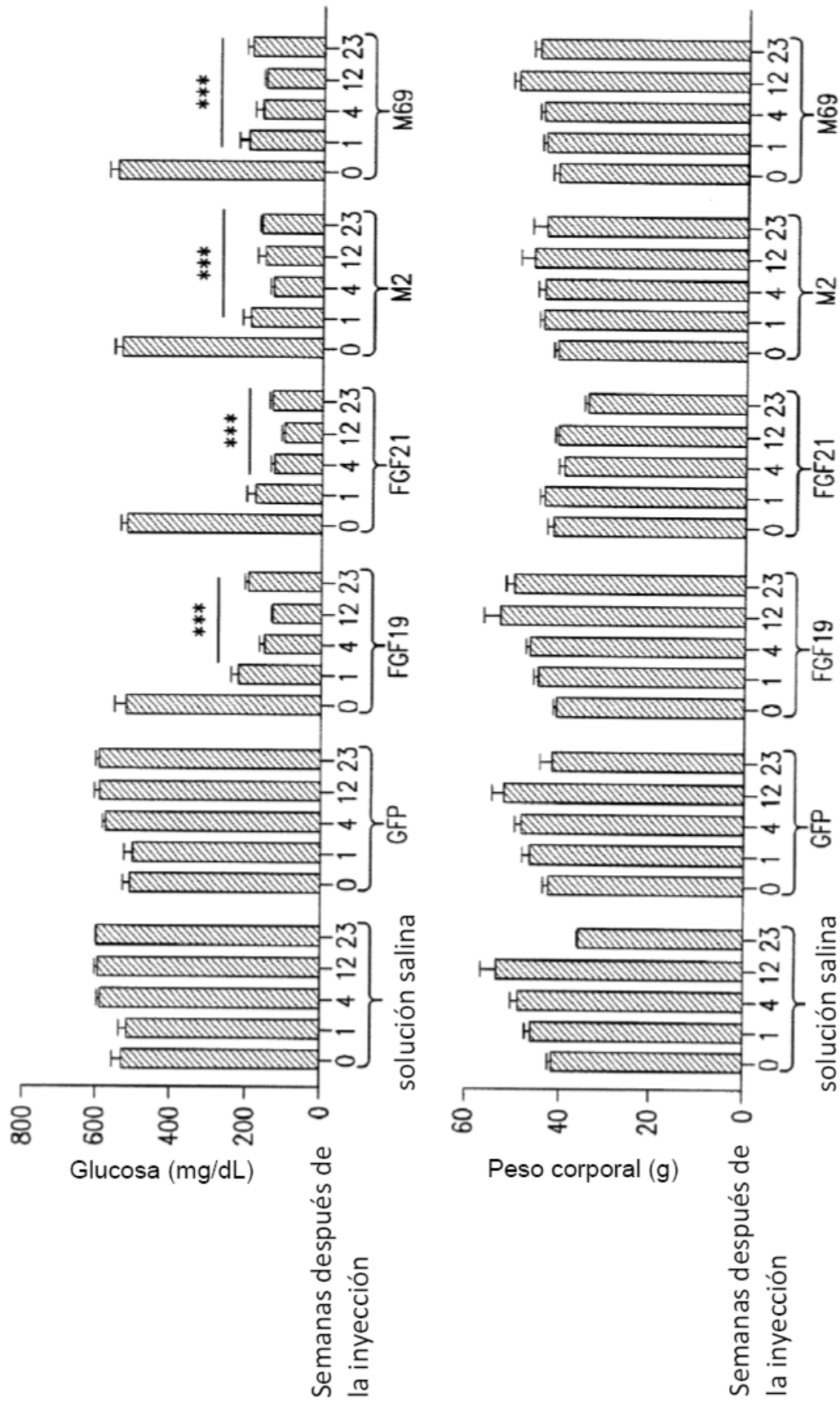
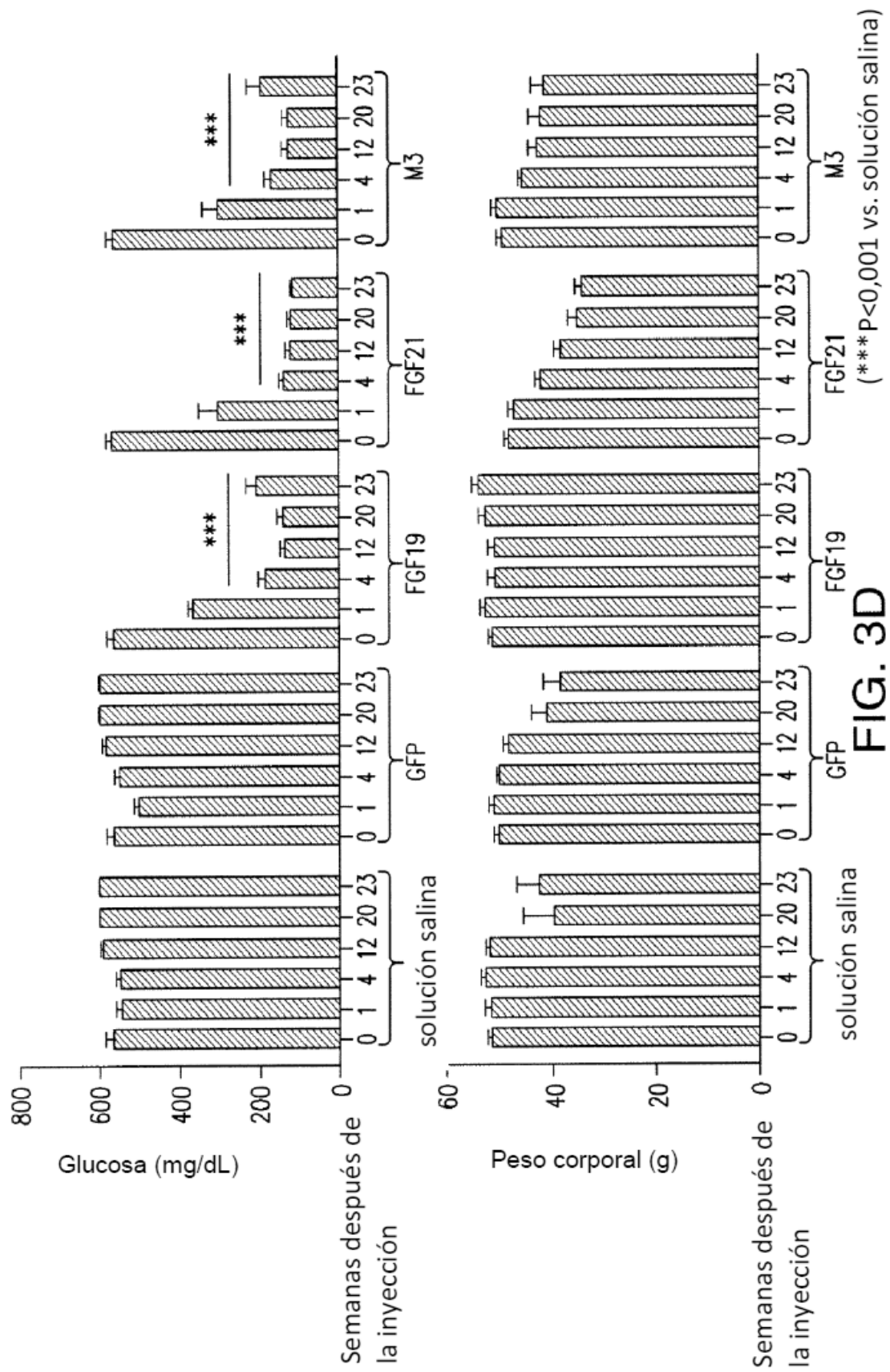
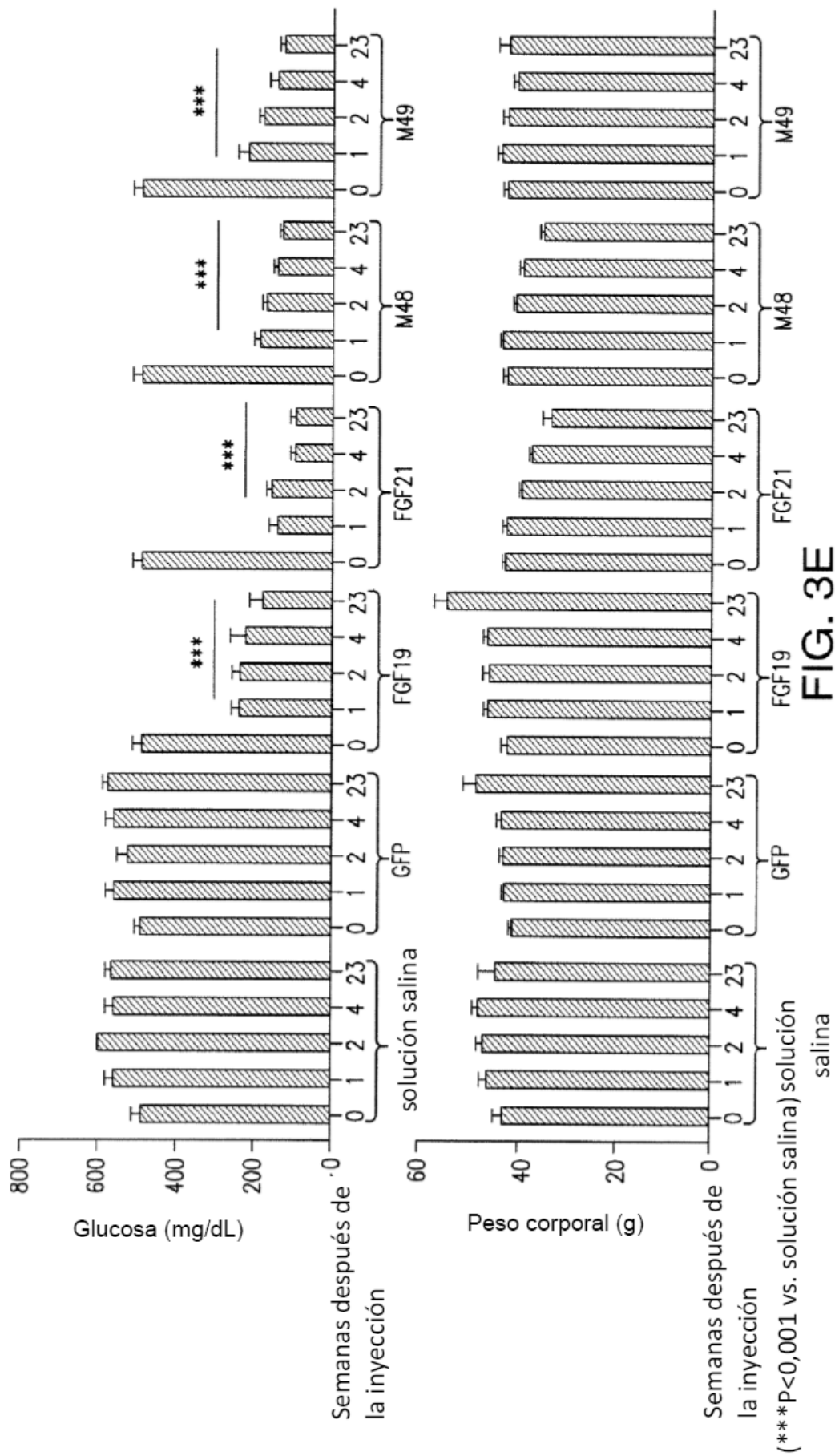
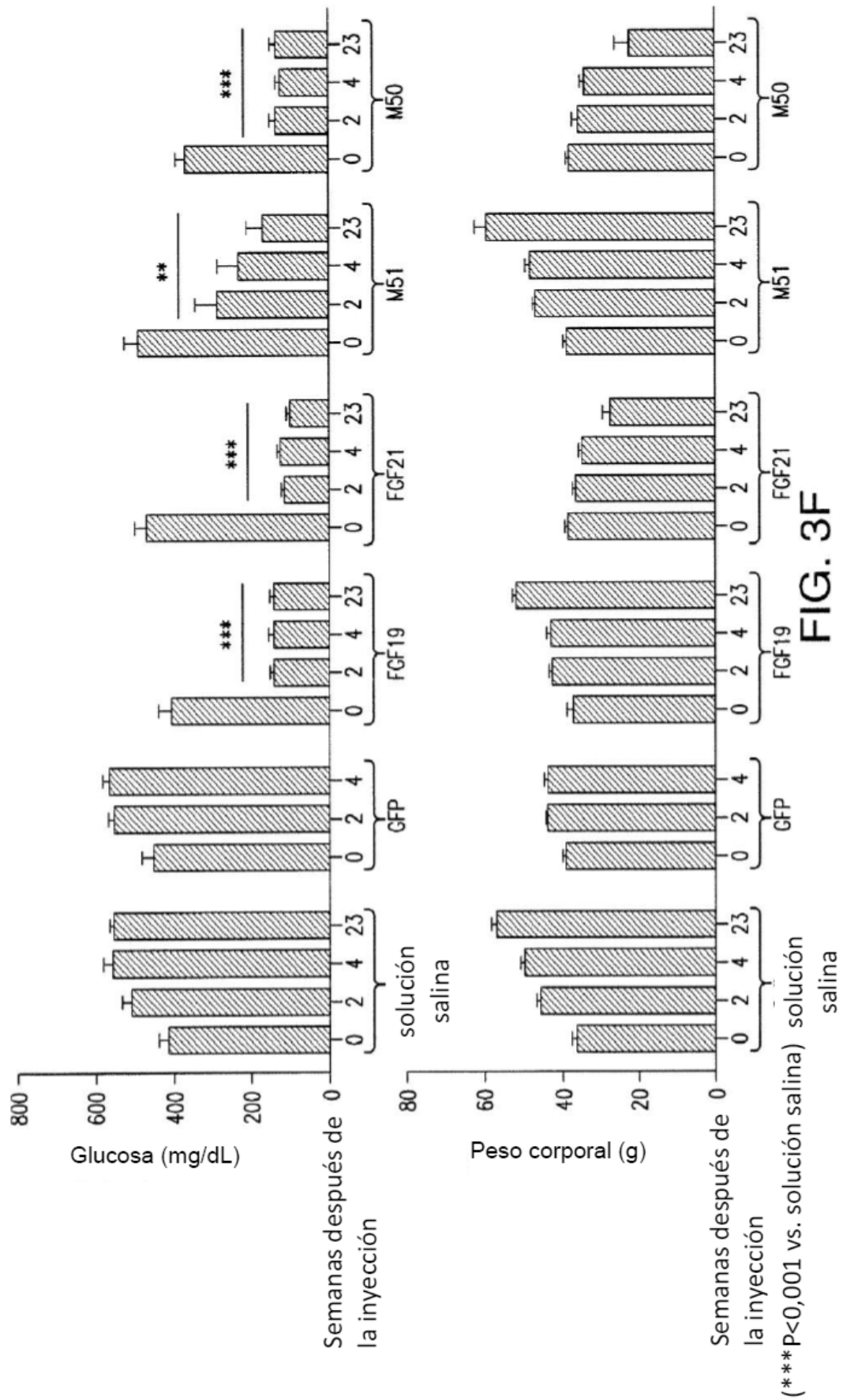


FIG. 3C (**P<0,001 vs. solución salina)







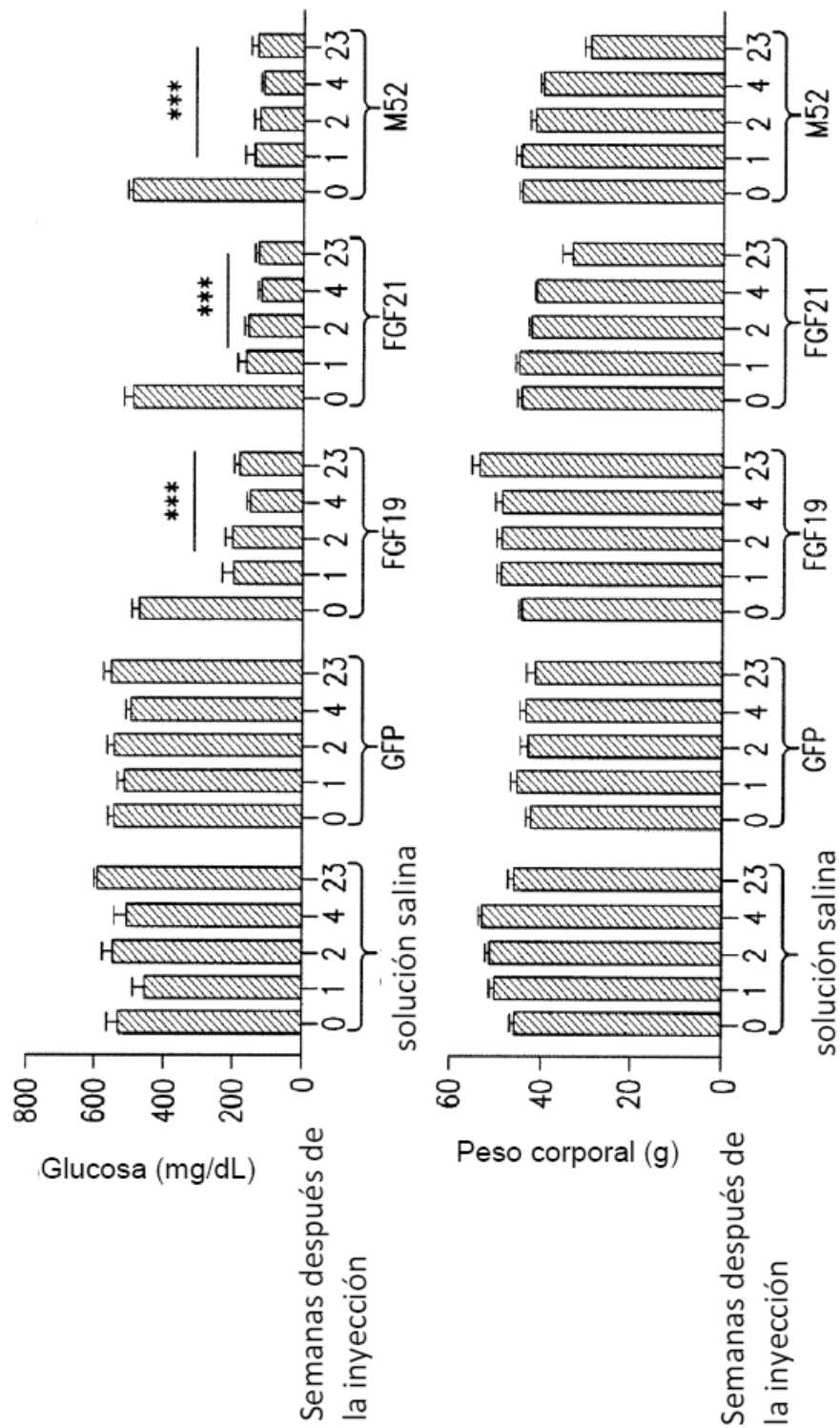


FIG. 3G (***) $P < 0,001$ vs. solución salina)

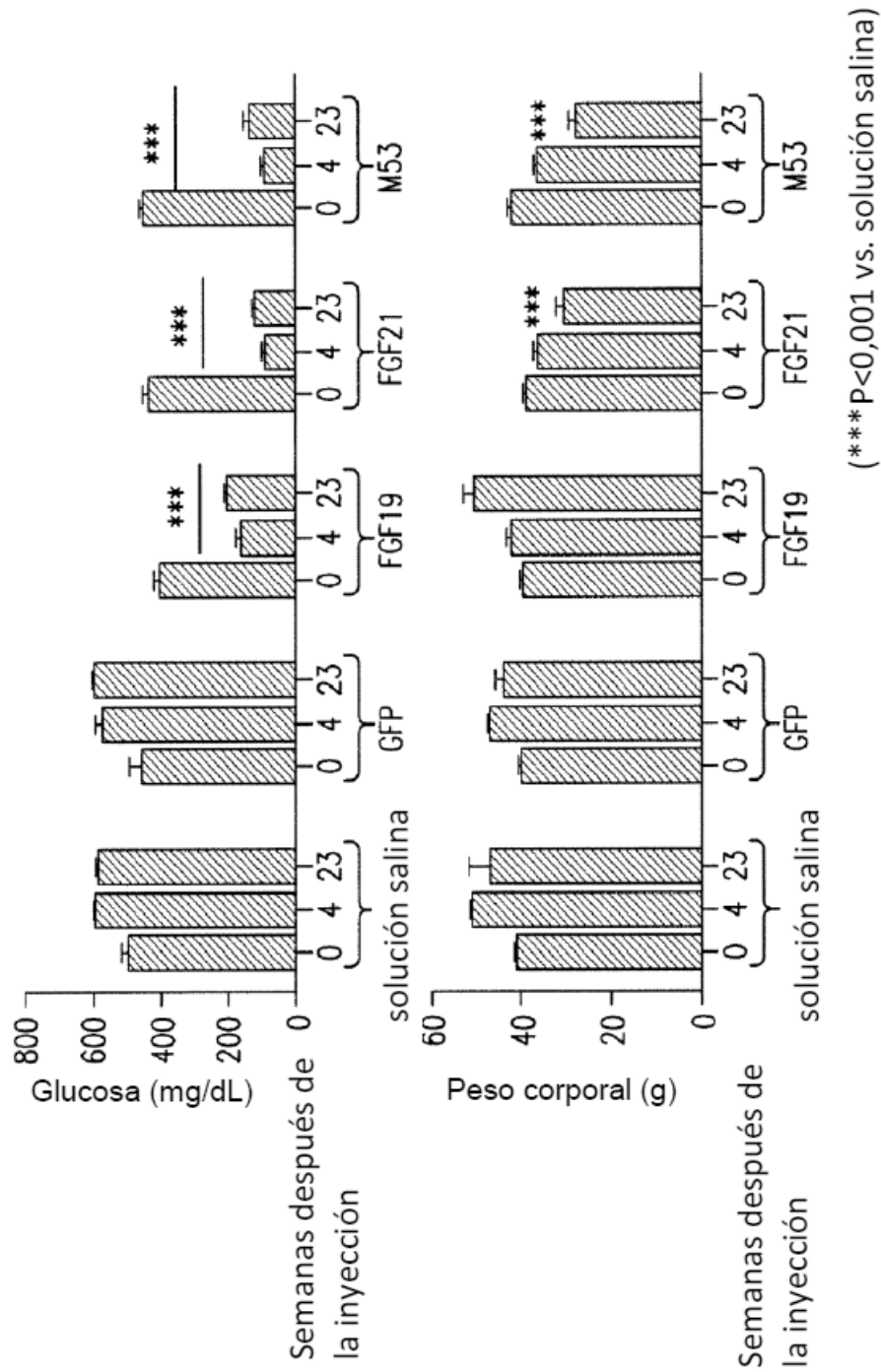


FIG. 3H

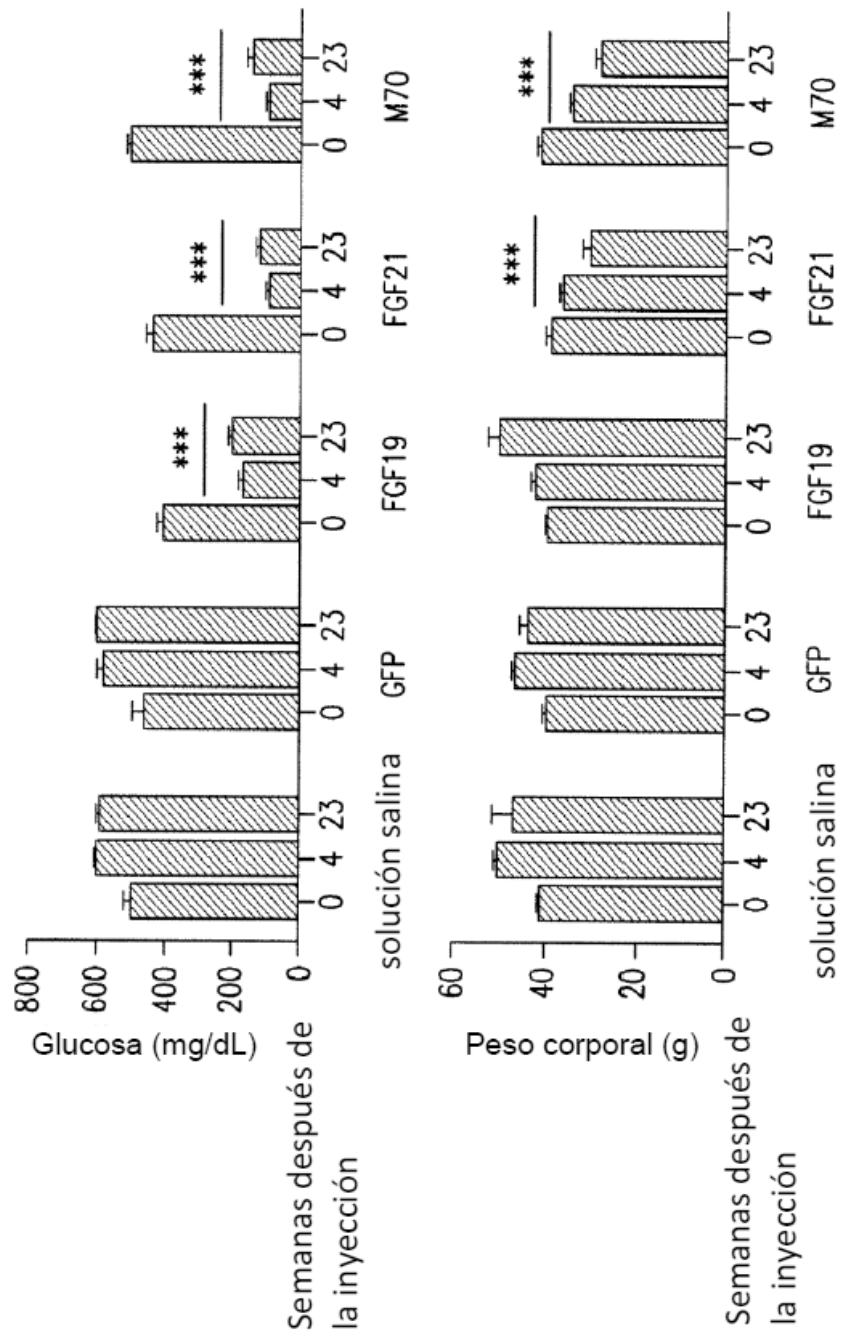
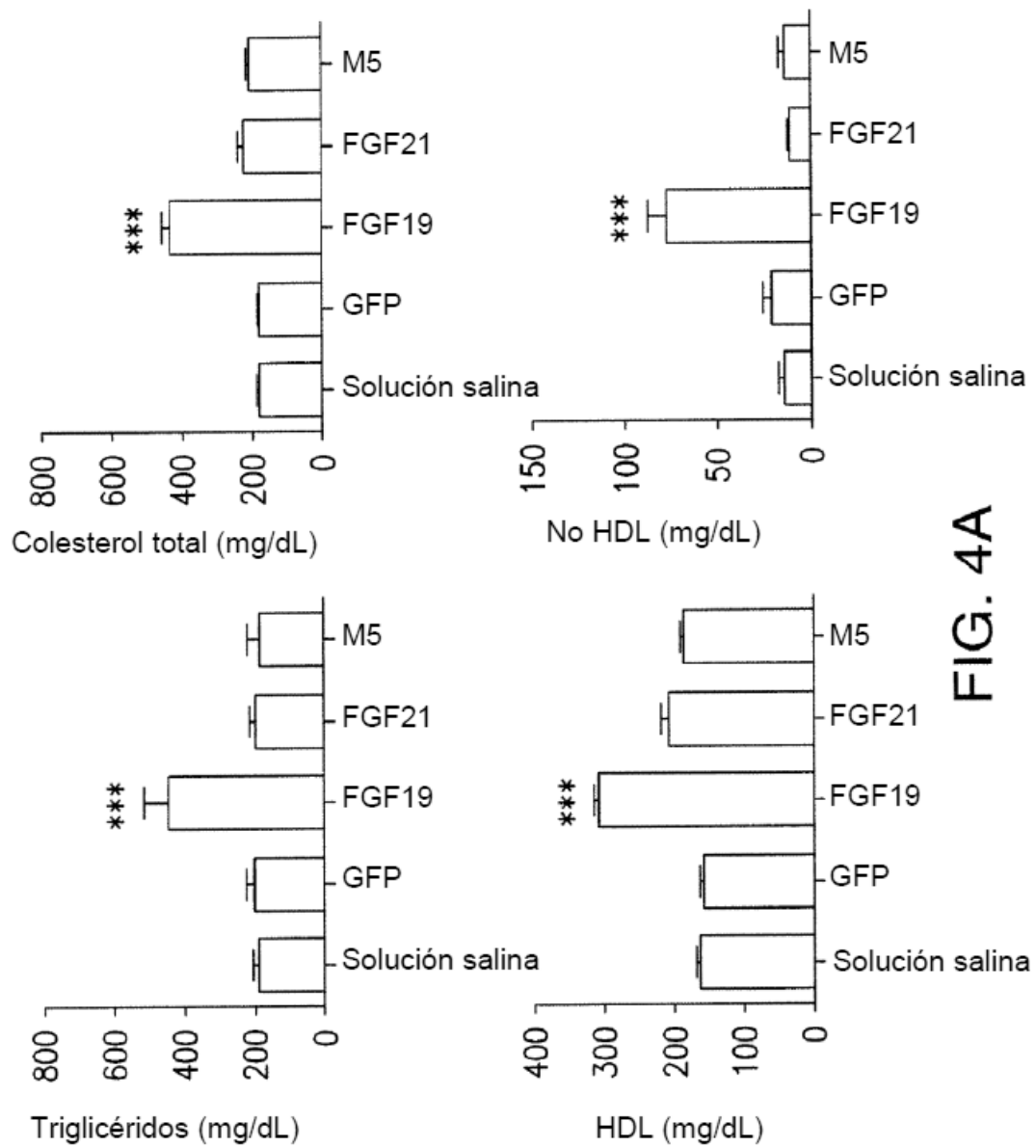


FIG. 3I



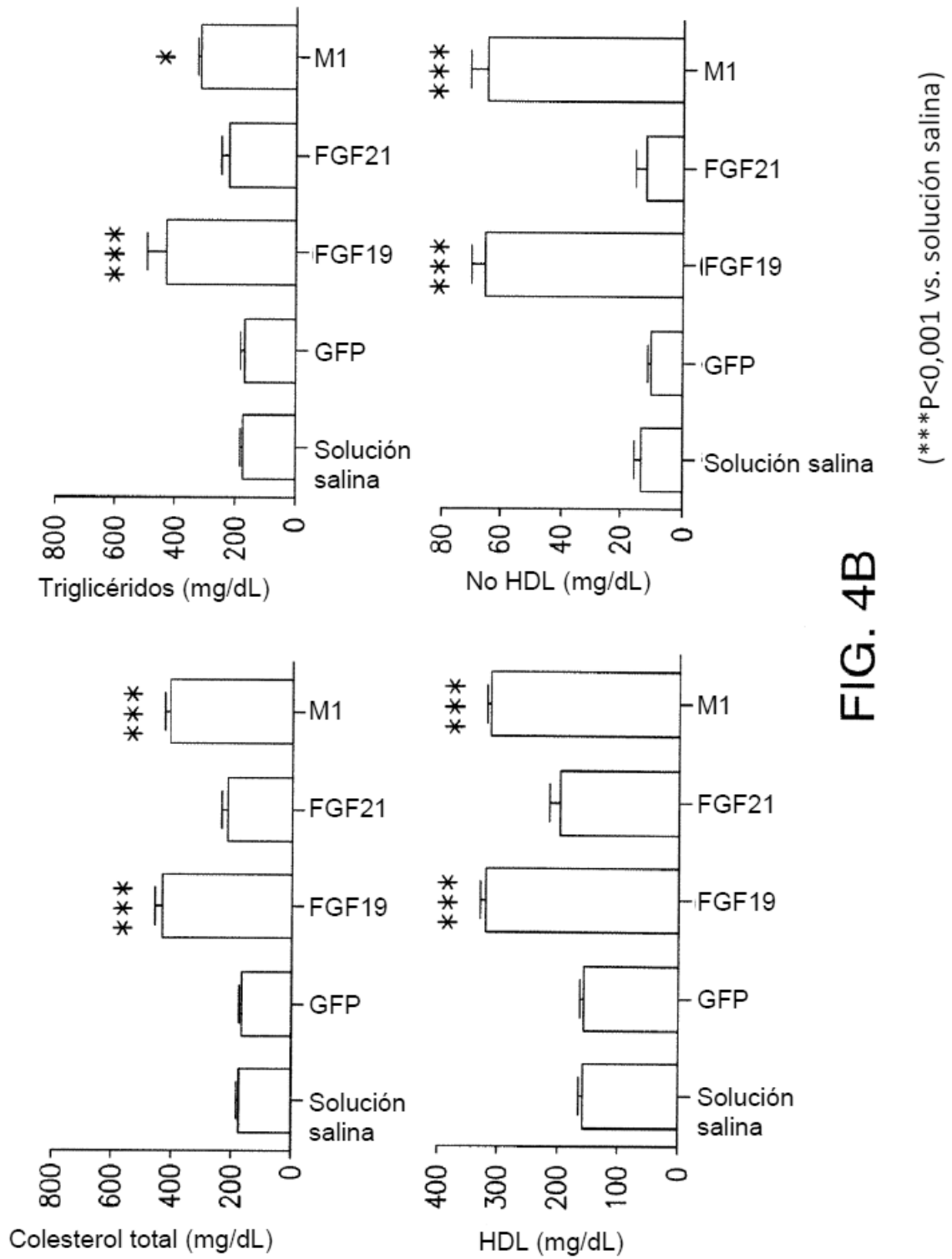
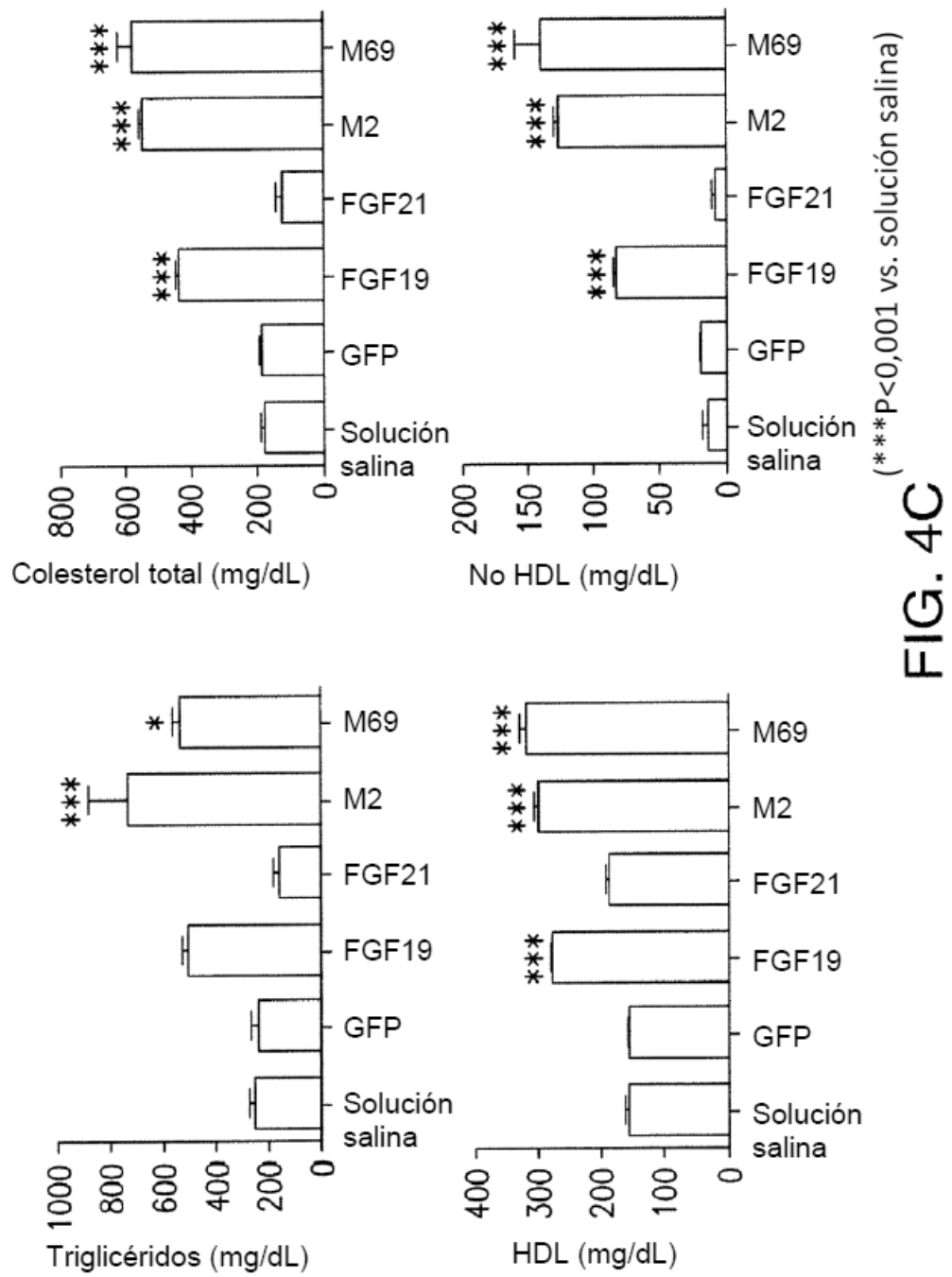
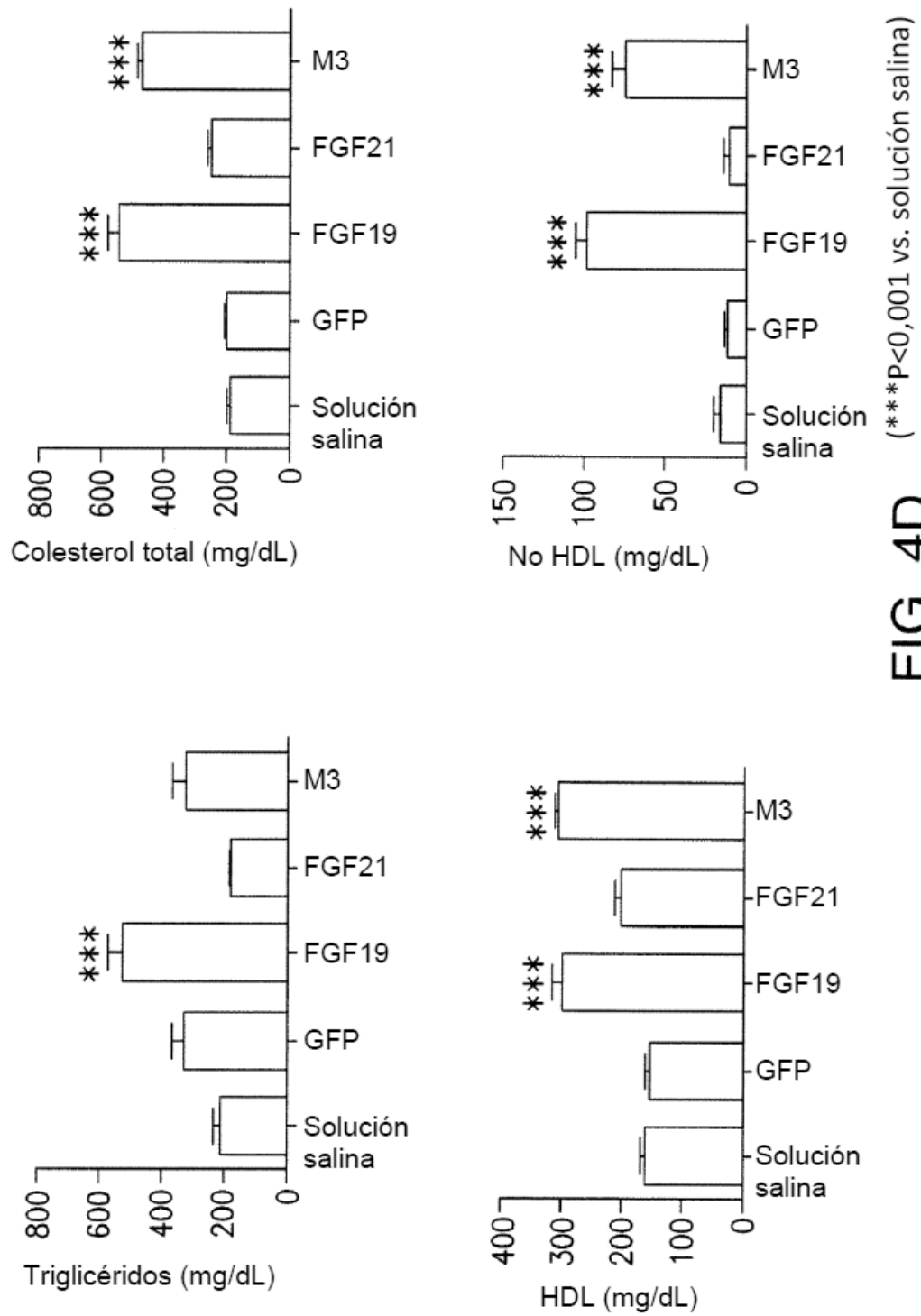


FIG. 4B





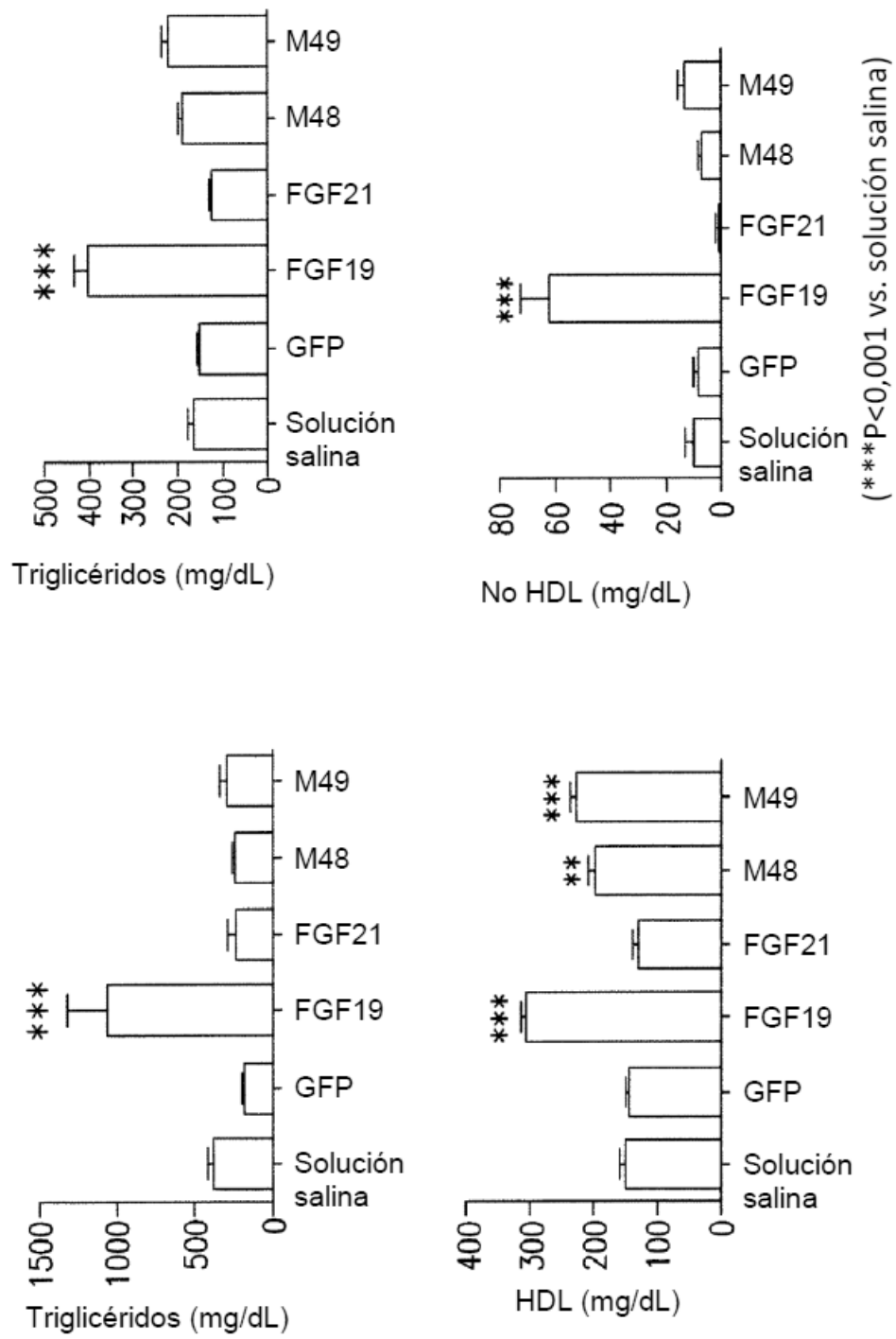


FIG. 4E

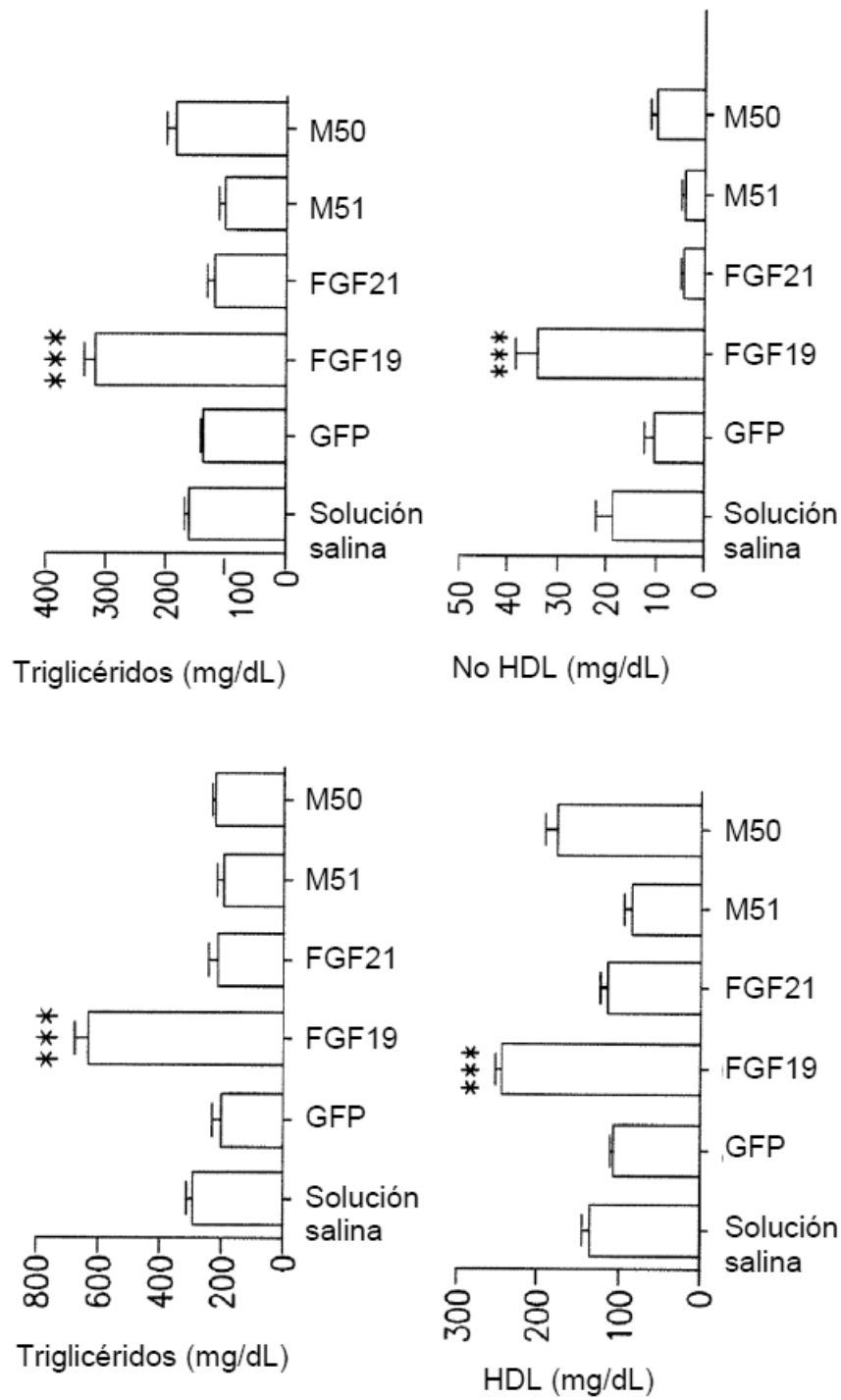


FIG. 4F
(***) $P < 0,001$ vs. solución salina)

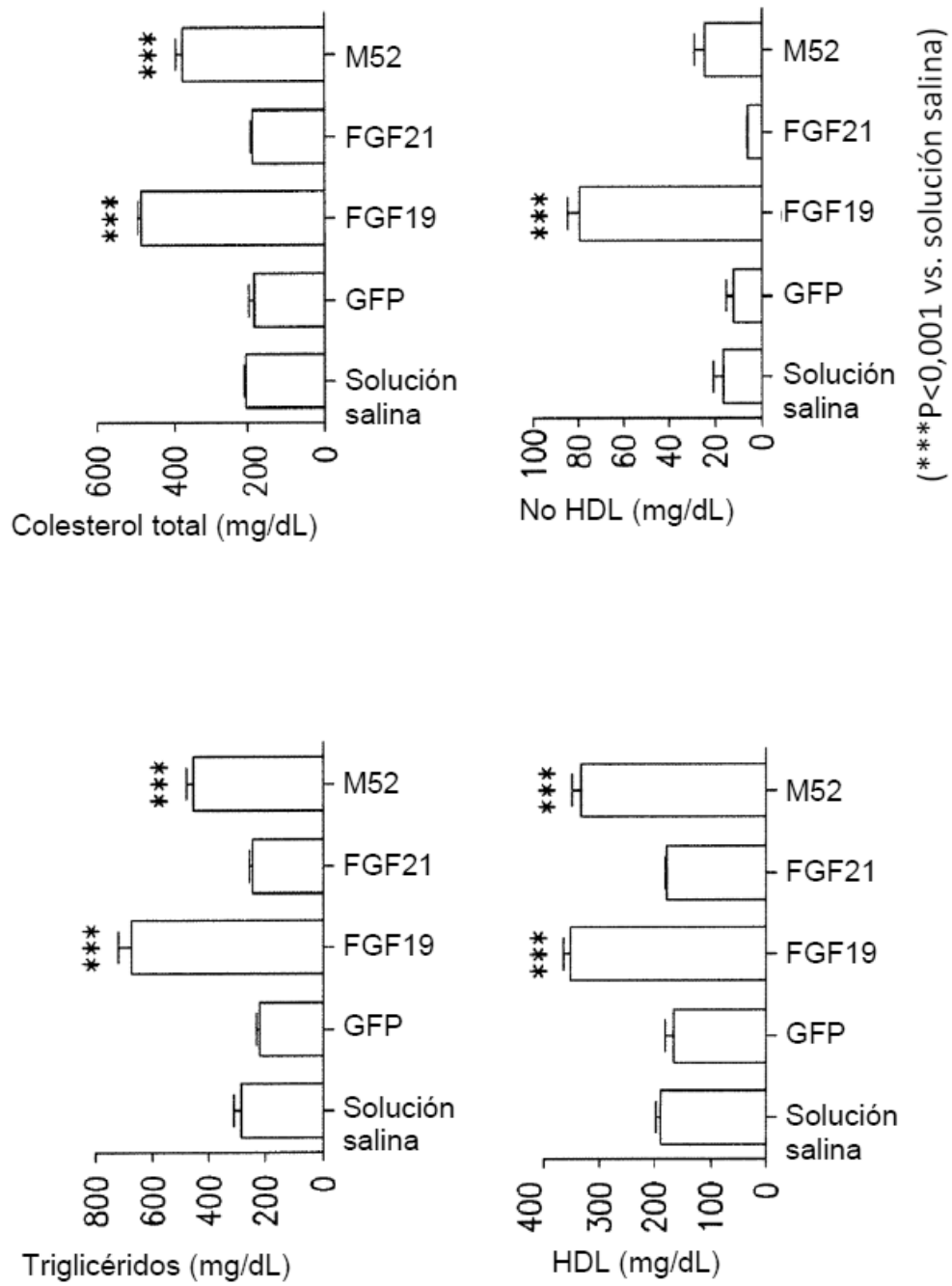
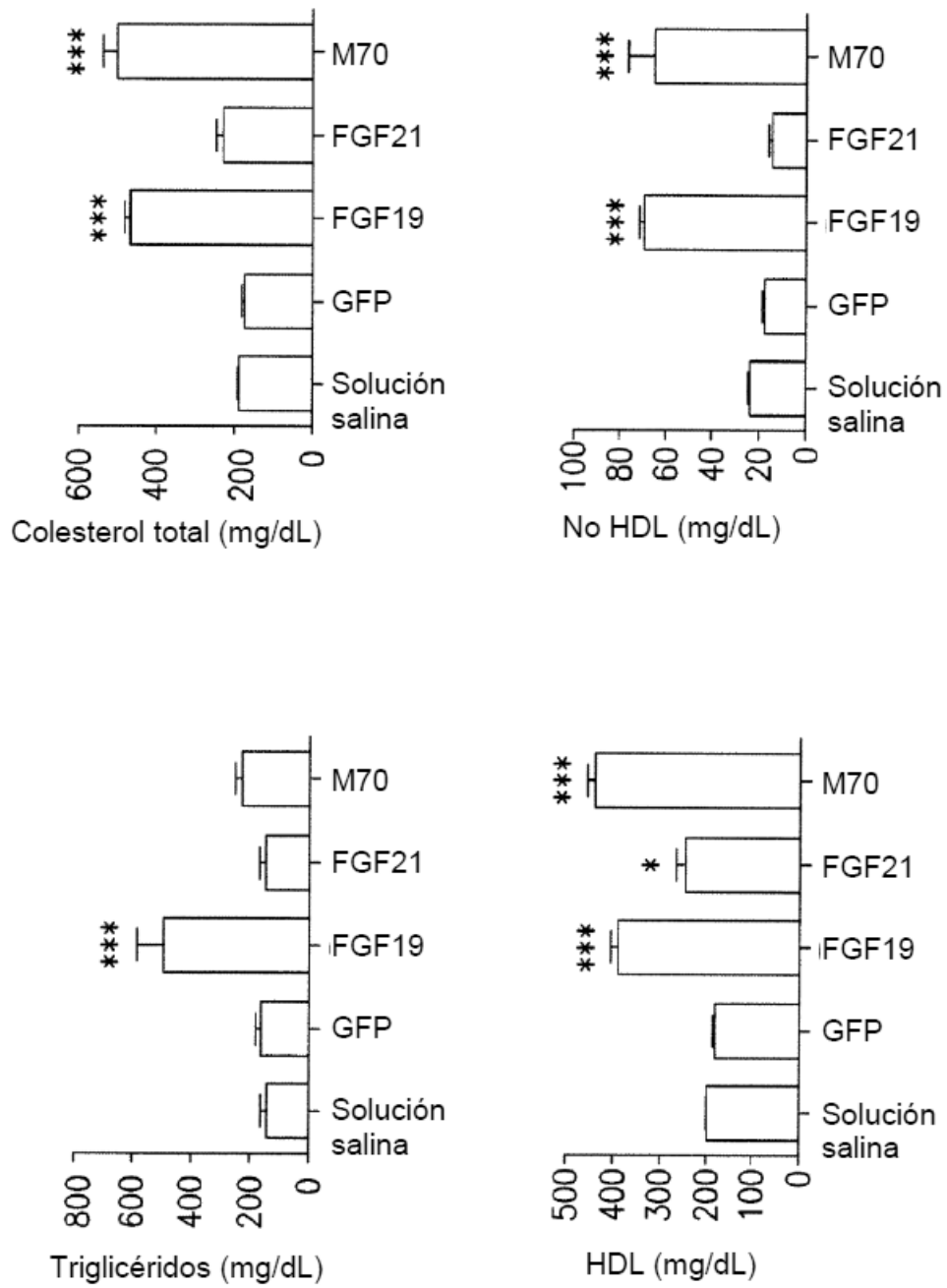


FIG. 4G



(***P<0,001 vs. solución salina)

FIG. 4H

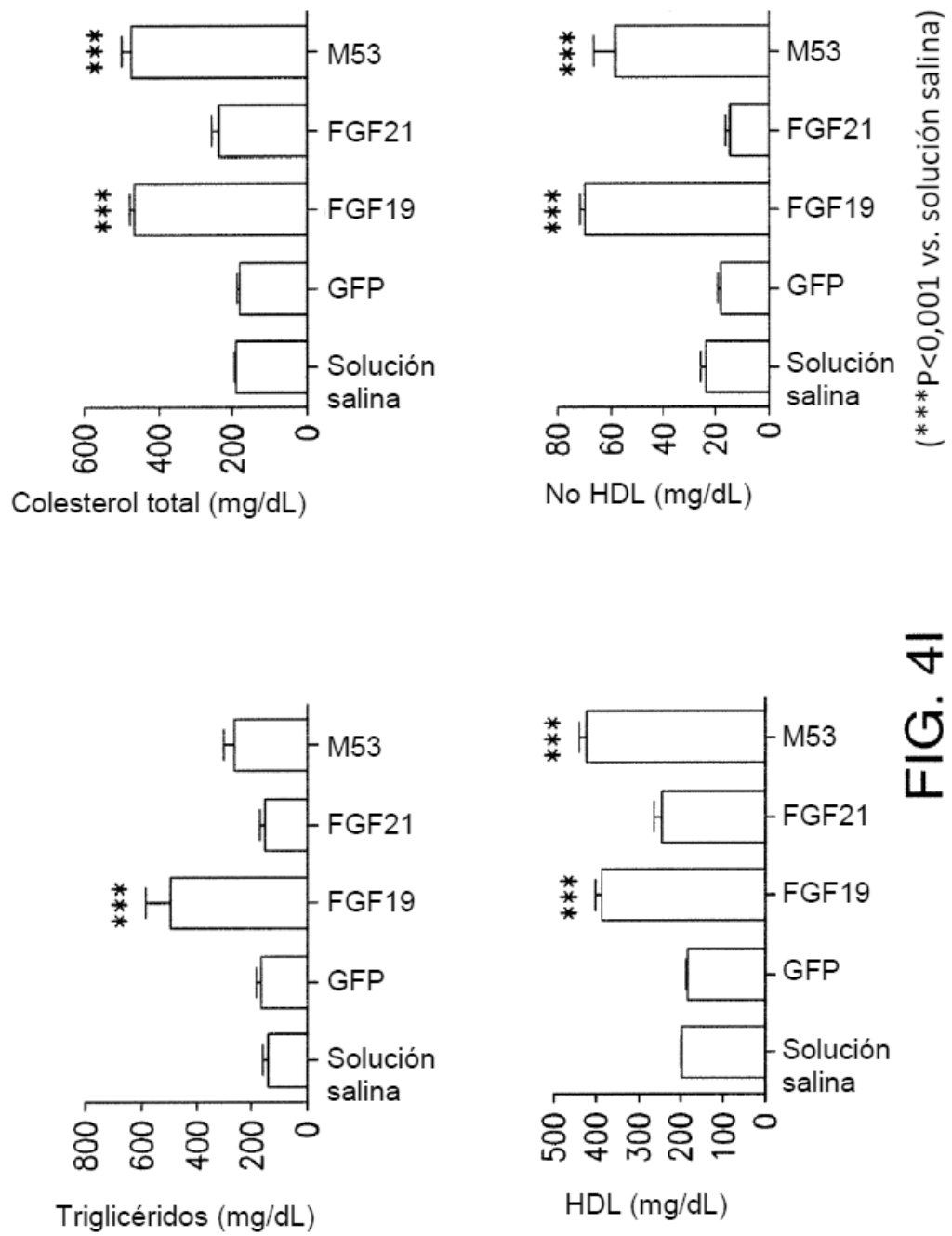


FIG. 4I

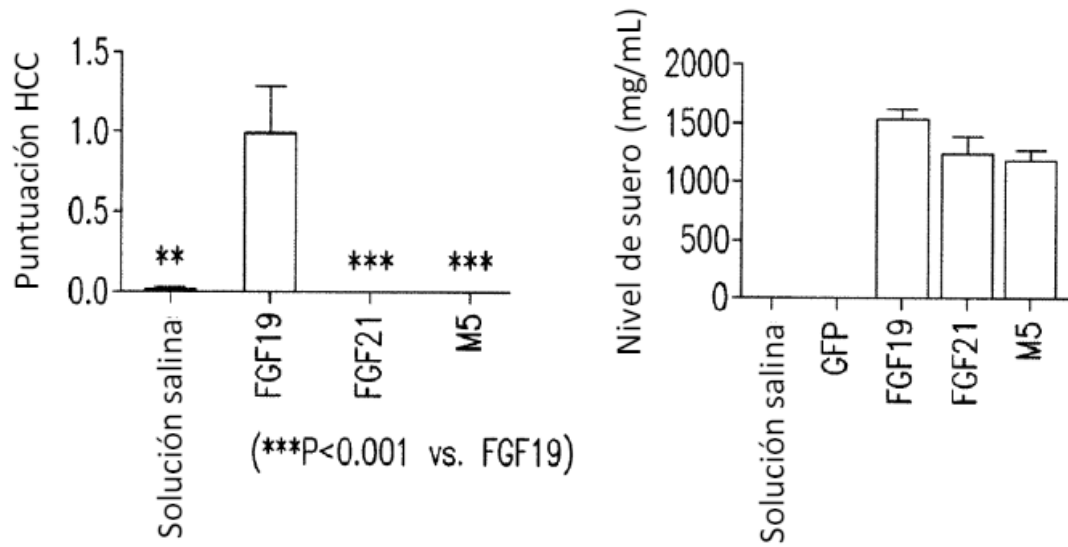


FIG. 5A

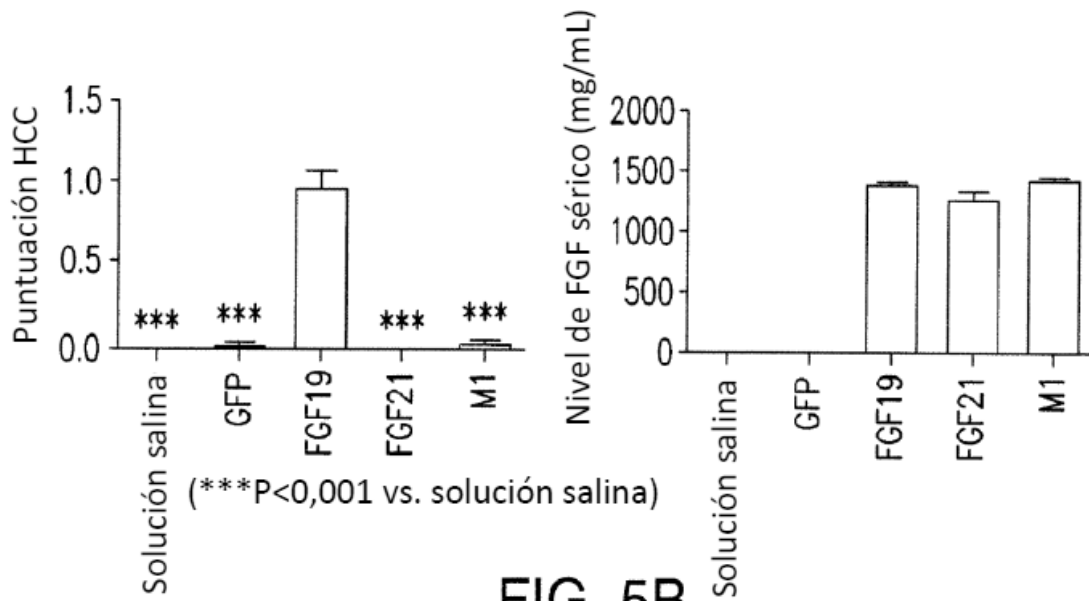


FIG. 5B

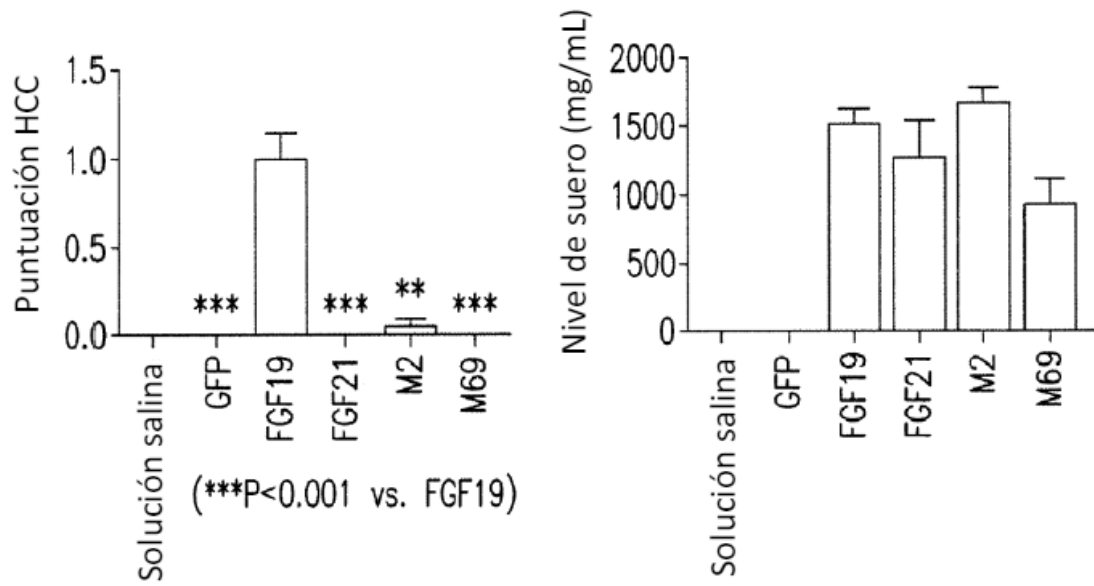


FIG. 5C

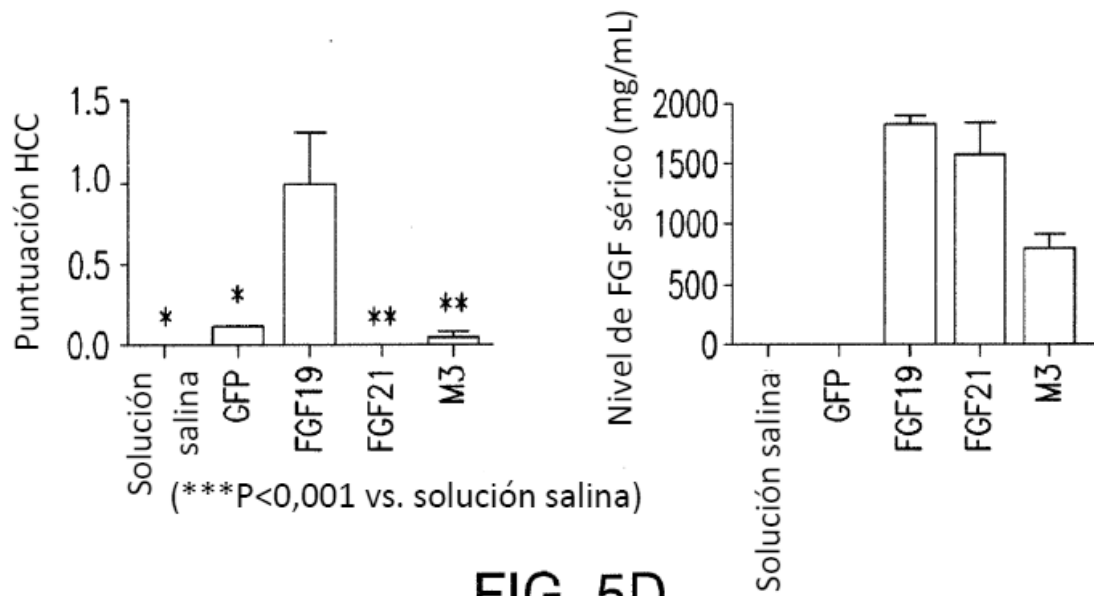


FIG. 5D

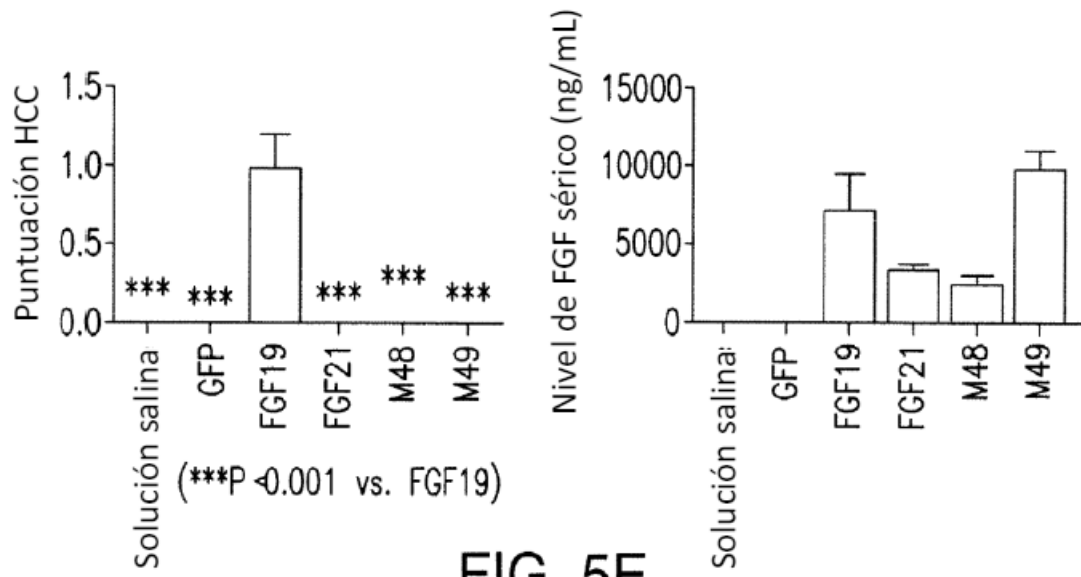


FIG. 5E

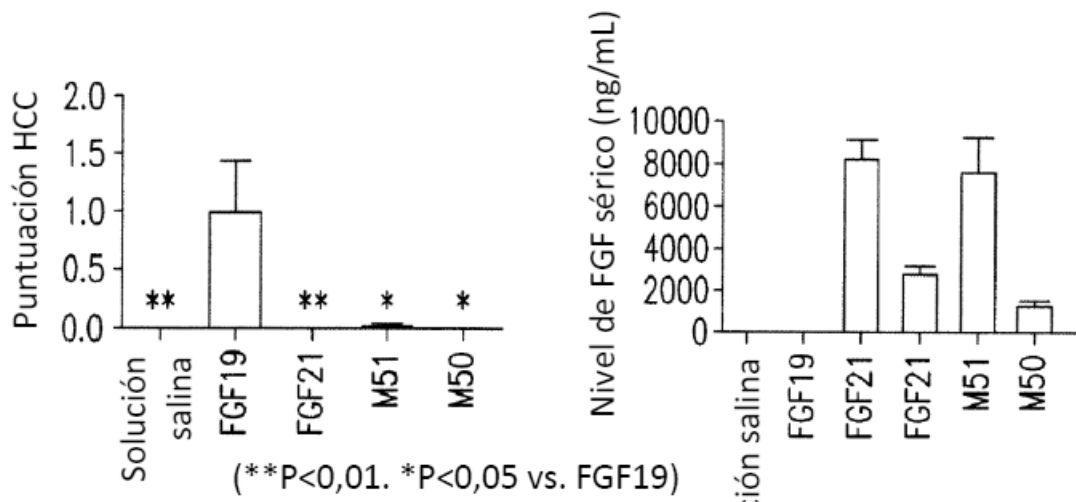


FIG. 5F

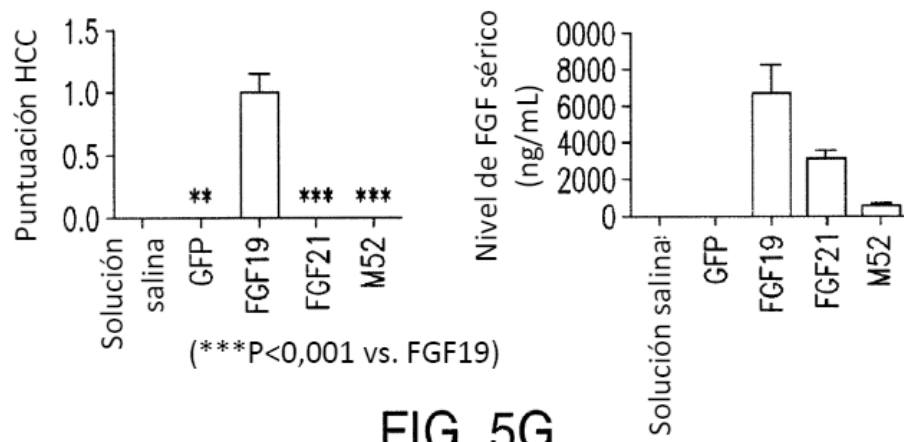


FIG. 5G

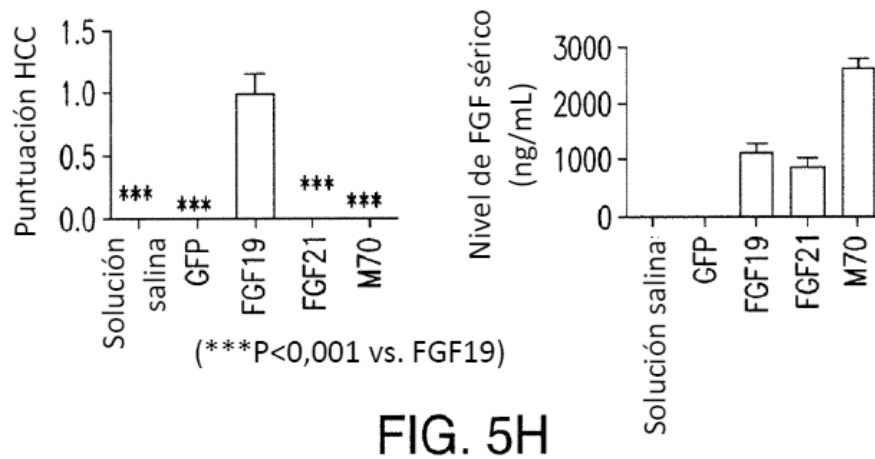


FIG. 5H

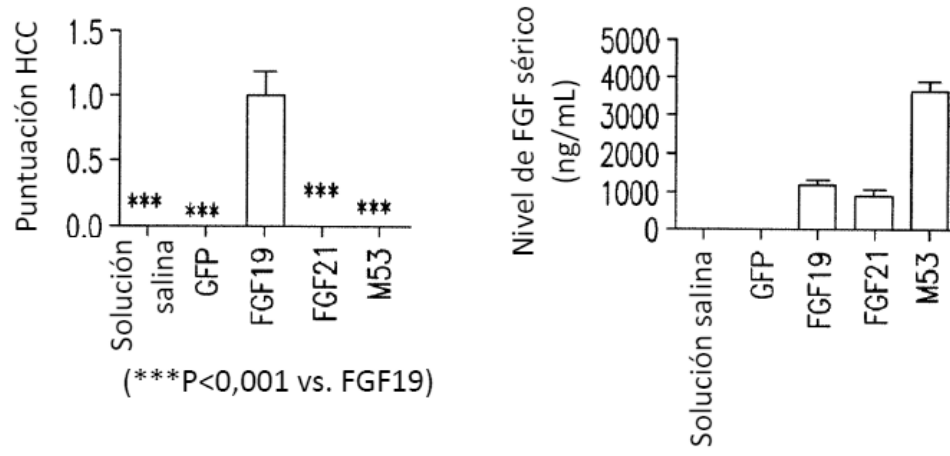


FIG. 5I

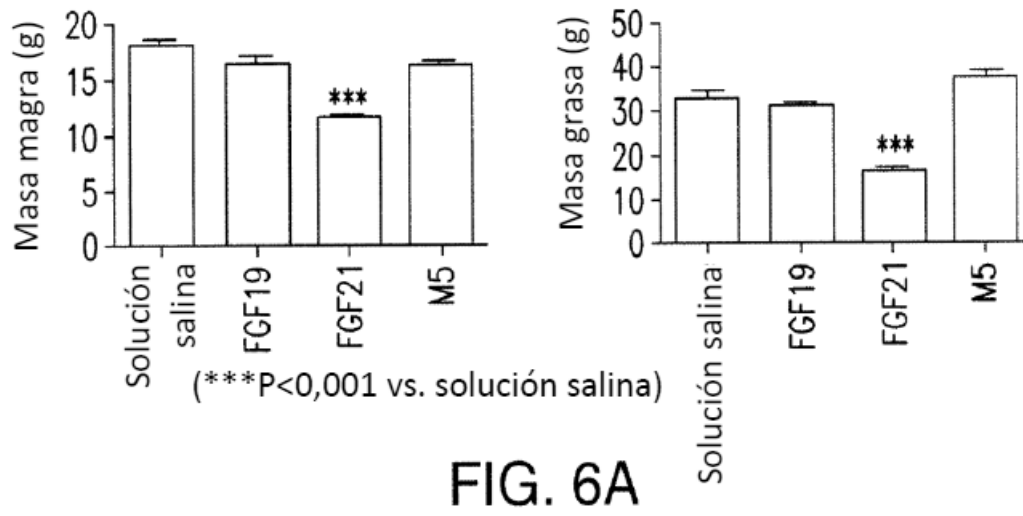


FIG. 6A

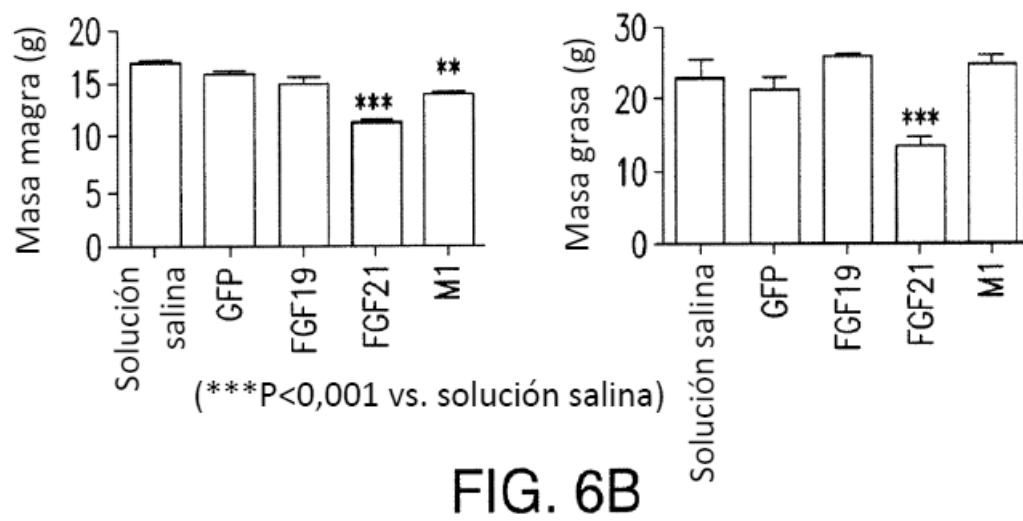


FIG. 6B

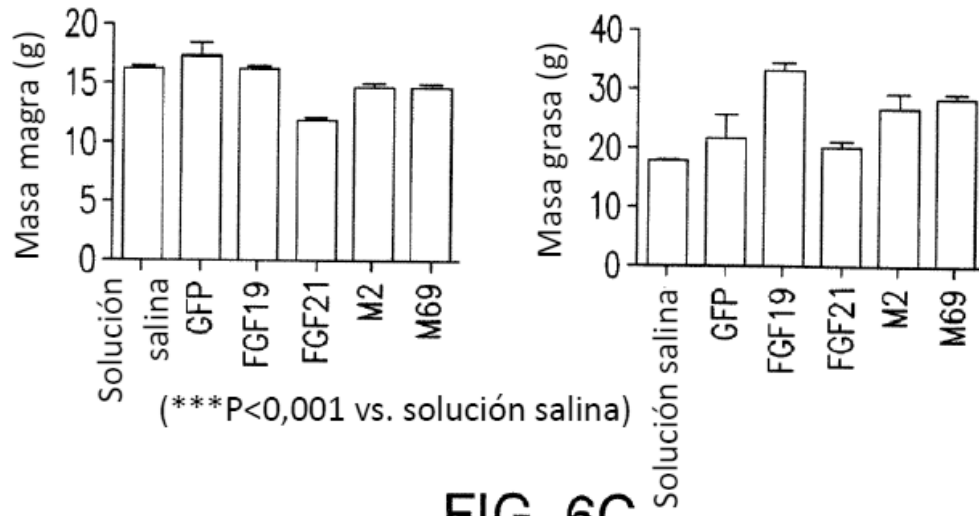


FIG. 6C

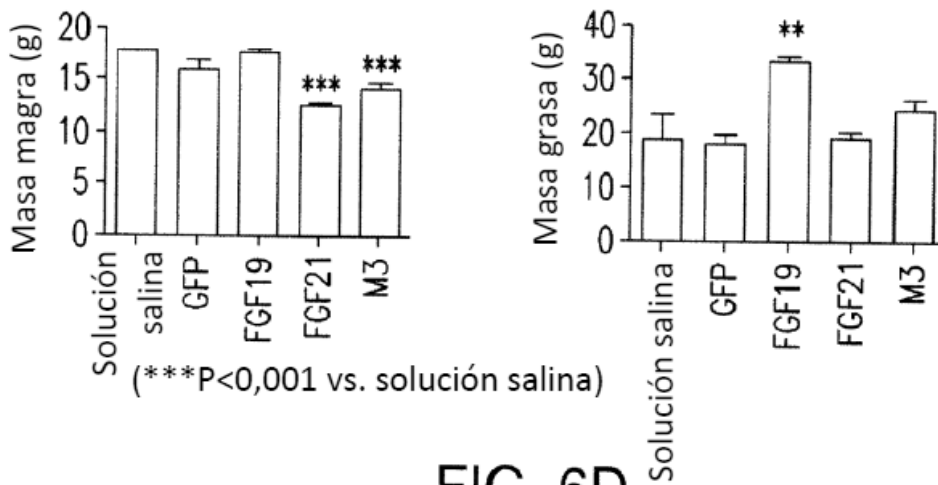


FIG. 6D

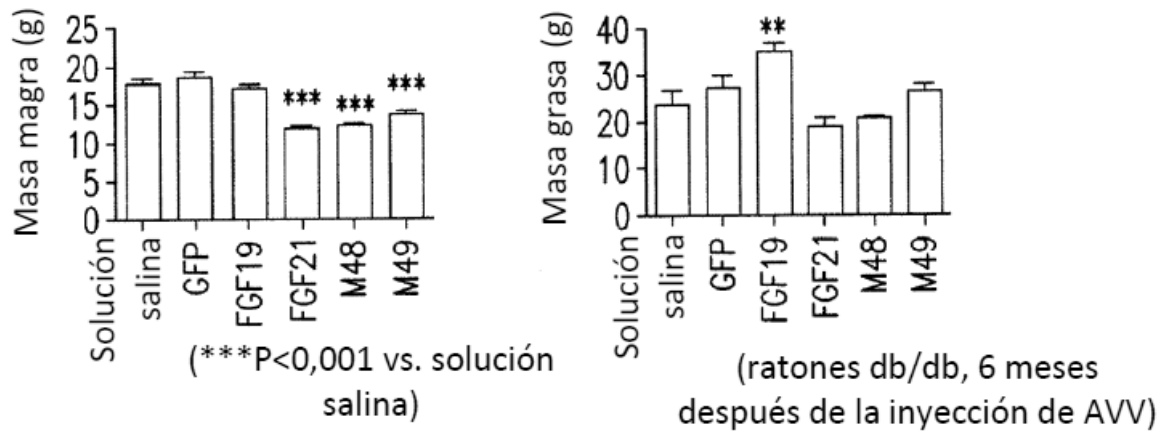


FIG. 6E

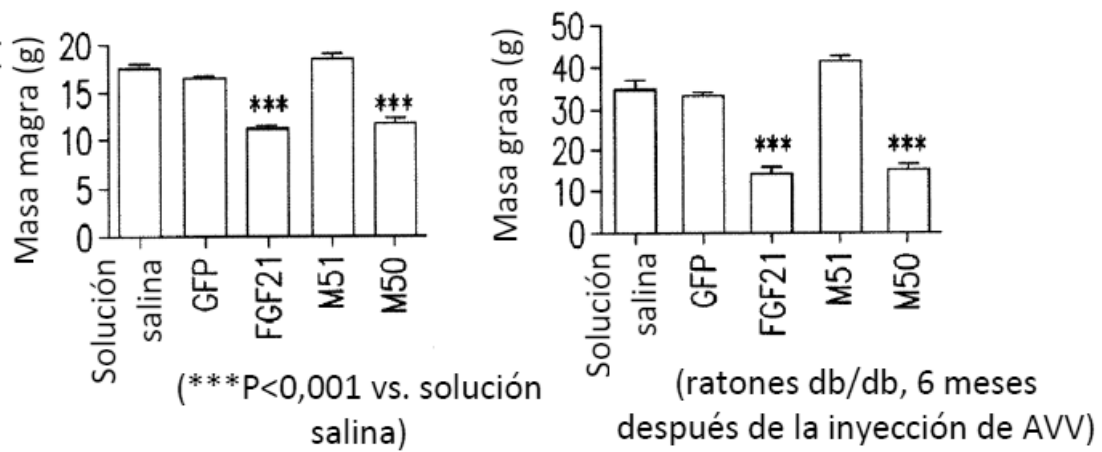


FIG. 6F

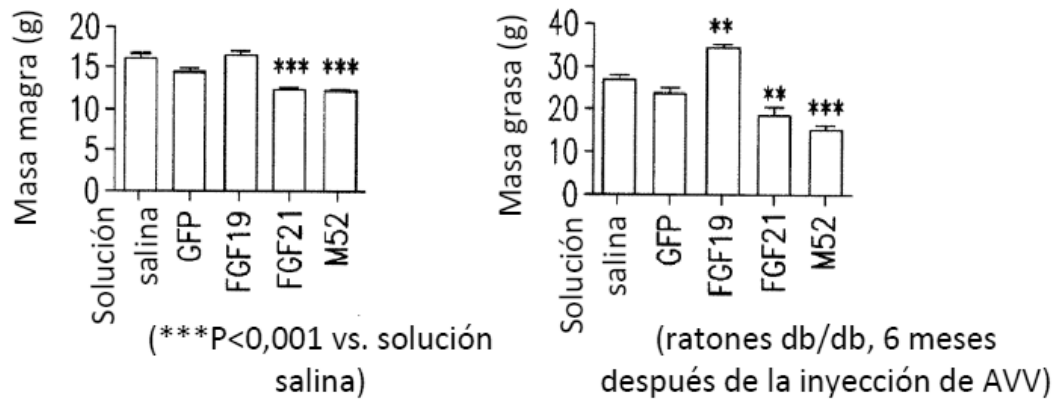


FIG. 6G

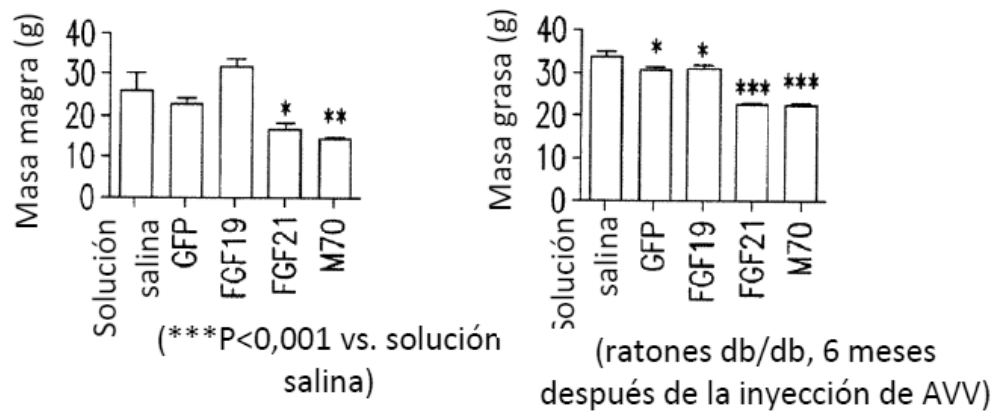


FIG. 6H

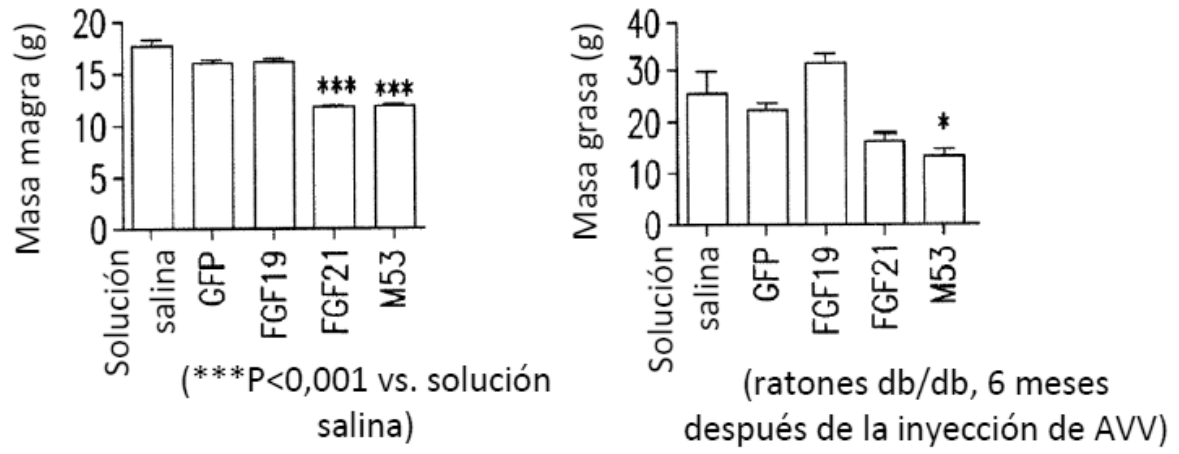


FIG. 6I

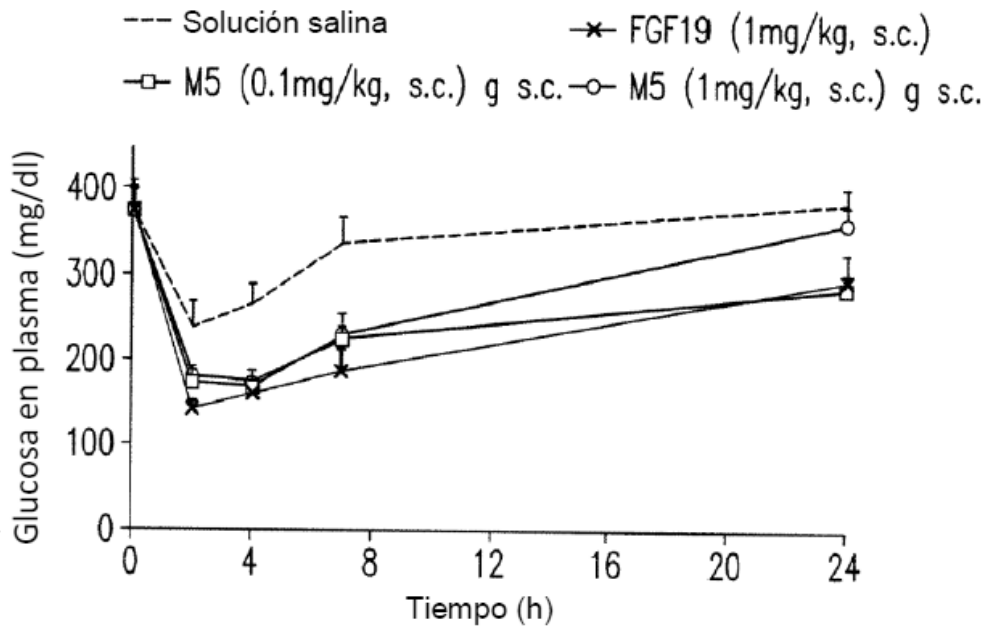


FIG. 7A

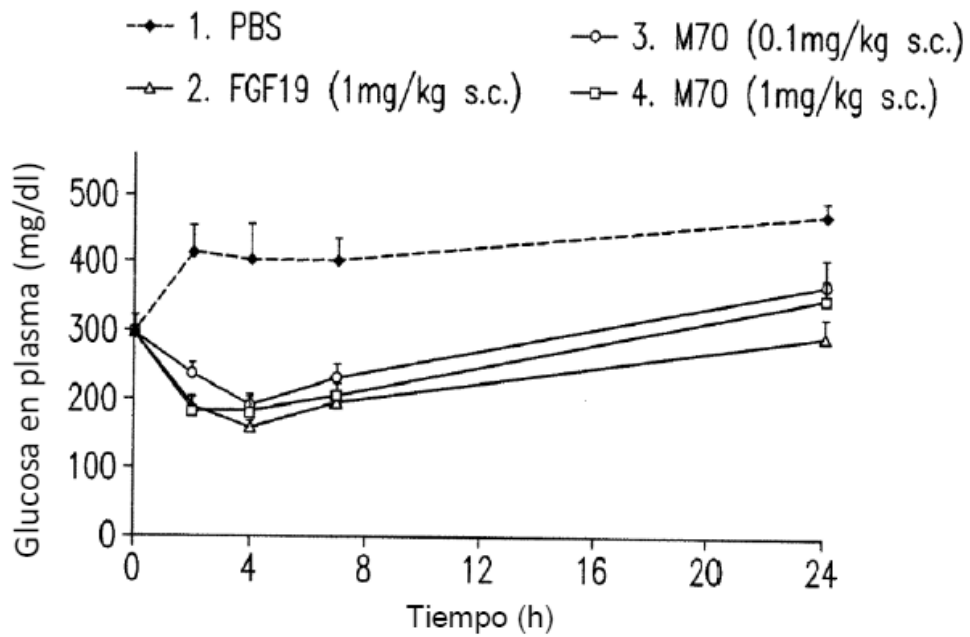


FIG. 7B

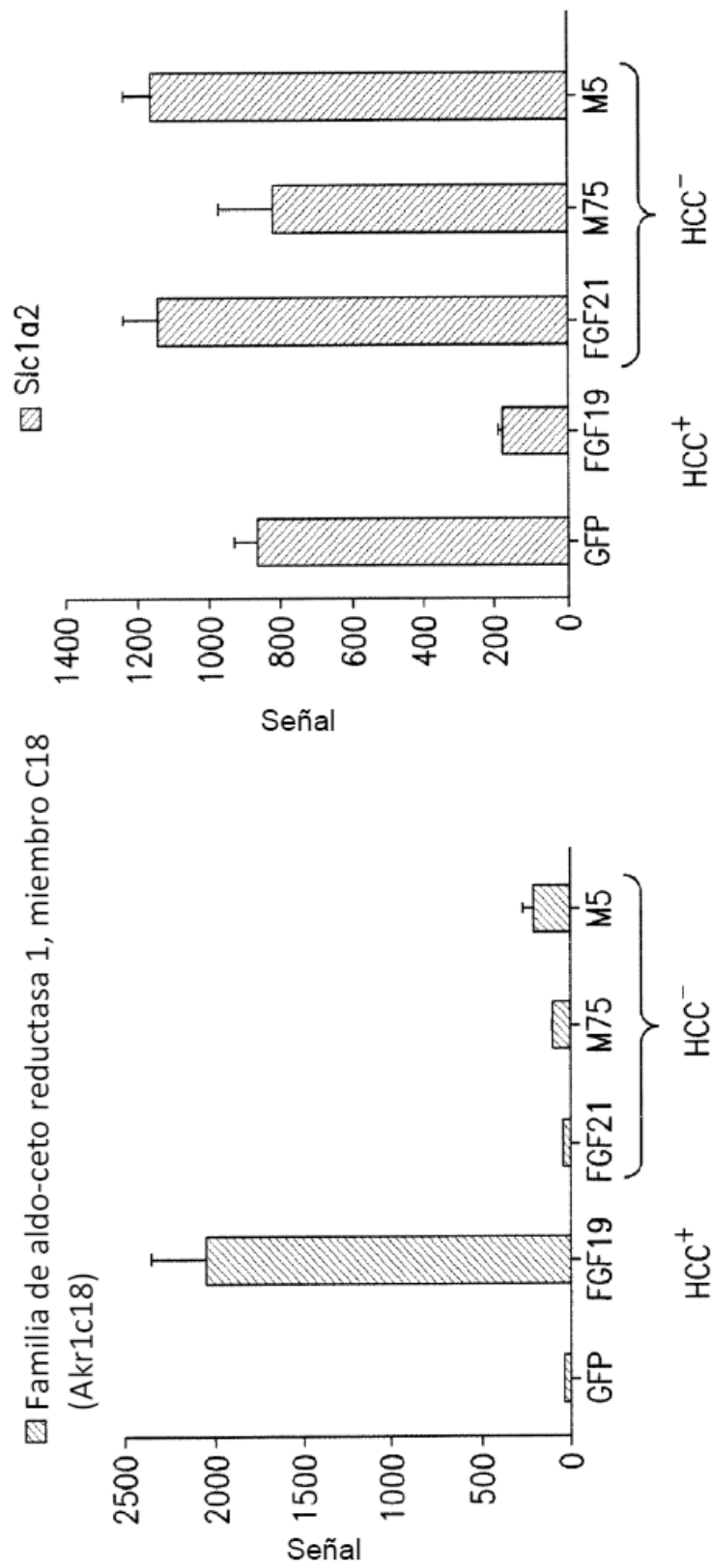


FIG. 8