

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 264**

51 Int. Cl.:

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: **27.10.2014 PCT/US2014/062378**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15065897**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2014 E 14857066 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3062881**

54 Título: **Modelos de cáncer y métodos asociados**

30 Prioridad:

28.10.2013 US 201361896473 P

31.12.2013 US 201361922586 P

22.10.2014 US 201462067273 P

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

07.04.2020

73 Titular/es:

NGM BIOPHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

333 Oyster Point Blvd.

South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

LING, LEI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 753 264 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

Modelos de cáncer y métodos asociados

Campo

5 La invención en general se refiere a variantes de FGF19 para su uso en métodos para antagonizar la actividad oncogénica de FGF19 en un sujeto y, en ciertas realizaciones, a métodos para prevenir o tratar una enfermedad, una afección o un trastorno, tal como una enfermedad, una afección o un trastorno dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas.

Antecedentes

10 La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica debilitante provocada por la ausencia de producción de insulina (de tipo 1), o por la resistencia a la insulina o por la producción insuficiente de insulina (de tipo 2) desde las células β pancreáticas, células endocrinas que fabrican y almacenan la insulina para su liberación después de una comida. Unos altos niveles de glucosa en sangre estimulan la secreción de insulina por las células β pancreáticas. La insulina, a su vez, estimula la entrada de glucosa en los músculos y las células adiposas, lo cual conduce al almacenamiento de glucógeno y triglicéridos y a la síntesis de proteínas. La activación de los receptores de insulina sobre diversos tipos de células disminuye los niveles de glucosa en la circulación aumentando la captación y utilización de glucosa y por medio de la reducción en la emisión de glucosa hepática. Las alteraciones dentro de esta red reguladora pueden provocar diabetes y trastornos patológicos asociados.

15 Un individuo con un trastorno del metabolismo de la glucosa puede padecer hiperglucemia, hiperinsulinemia y/o intolerancia a la glucosa, junto con un conjunto de trastornos relacionados. Por ejemplo, la resistencia a la insulina, un trastorno a menudo asociado con niveles aberrantes de glucosa y/o insulina, se caracteriza porque las células hepáticas, grasas y musculares pierden su capacidad para responder a niveles normales de insulina en sangre. Estos trastornos del metabolismo de la glucosa afectan de modo adverso a un número alto y creciente de individuos por todo el mundo.

20 La obesidad, que está provocada, con más frecuencia, por una ingesta excesiva de alimentos, junto con un gasto energético limitado y/o falta de ejercicio físico, a menudo acompaña a diversos trastornos del metabolismo de la glucosa. La obesidad aumenta la probabilidad de que un individuo desarrolle diversas enfermedades, tales como diabetes mellitus, hipertensión, aterosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria, gota, reumatismo y artritis. Además, el riesgo de mortalidad se correlaciona directamente con la obesidad, de modo que, por ejemplo, un índice de masa corporal mayor que 40 produce una disminución promedio en la esperanza de vida de más de 10 años.

25 Ciertas modalidades de tratamiento farmacológico han demostrado, en diversos grados, una actividad antiobesidad y homeostática de la glucosa. Por desgracia, dichas modalidades se han asociado con frecuencia a efectos adversos graves y a menudo debilitantes.

30 A la vista de la prevalencia y la gravedad de la diabetes, la obesidad y los trastornos metabólicos y no metabólicos asociados, junto con los defectos de las opciones de tratamiento actuales, son necesarias otras modalidades de tratamiento.

35 Se ha propuesto la cirugía bariátrica como un tratamiento alternativo no farmacológico para la diabetes. Se ha postulado que los cambios en la secreción de hormonas del intestino tras la cirugía son responsables de la resolución de los trastornos diabéticos. Tras una cirugía de derivación gástrica, los niveles en suero del factor de crecimiento de fibroblastos 19 ("Fibroblast Growth Factor 19", FGF19) aumentan en seres humanos. El FGF19 se expresa mucho en el intestino delgado distal, y la sobreexpresión transgénica de FGF19 mejora la homeostasis de la glucosa (Tomlinson, E. (2002), *Endocrinology*, 143(5):1741-1747). La expresión y secreción aumentada de FGF19 puede explicar, al menos parcialmente, la remisión de la diabetes observada tras la cirugía.

40 A pesar de los efectos metabólicos deseables atribuibles al FGF19 (por ejemplo, disminución de la glucosa en sangre), los tratamientos que aumentan los niveles de FGF19 (por ejemplo, a través de la potenciación de la expresión de FGF19 o la administración de FGF19 exógeno) están asociados con la inducción de carcinoma hepatocelular ("hepatocellular carcinoma", HCC). Por tanto, en la actualidad se están realizando esfuerzos para identificar agentes que posean las características favorables del FGF19 sin inducir trastornos cancerosos, tales como HCC. La presente descripción se basa, en parte, en modelos animales y métodos asociados para ayudar a la determinación precisa y eficaz de si un agente candidato posee dichos atributos y si un sujeto es un candidato viable para dicho tratamiento.

45 El documento US 2013/023474 se refiere a variante y fusiones de FGF19 y FGF21 que tienen actividades útiles en el tratamiento de trastornos metabólicos.

50 M. Zhou *et al.* ("Separating Tumorigenicity from Bile Acid Regulatory Activity for Endocrine Hormone FGF19", *Cancer Research*, EE. UU. (15-06-2014), vol. 74, n.º 12, pp. 3306-3316) se refieren a la eliminación de la actividad tumorigénica de FGF19.

Sumario

- La invención proporciona un variante de FGF19 para su uso en un método para prevenir o tratar un cáncer o tumor dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas, en un sujeto, o en un método para antagonizar la actividad oncogénica de FGF19 en un sujeto, en el que el variante de FGF19 comprende en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.
- 5 En una realización, el variante de FGF19 comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.
- En una realización, el variante de FGF19 consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.
- Por consiguiente, la expresión "variante de FGF19" significa un polipéptido que comprende o que consiste en SEQ ID NO:1.
- 10 En otra realización, el cáncer o tumor dependiente de FGF19 es un carcinoma hepatocelular. En otra realización, el cáncer o tumor dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor de colon. En otra realización, el cáncer o tumor dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor de próstata. En otra realización, el cáncer o tumor dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor de pulmón.
- En otra realización, el sujeto padece un trastorno metabólico.
- 15 En otra realización, el sujeto muestra un indicio de un trastorno canceroso inducido por FGF19. En otra realización, el trastorno canceroso es un tumor. En otra realización, el tumor es un tumor hepático o un tumor de colon.
- En otra realización, el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en un trastorno hiperglucémico, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, obesidad y síndrome metabólico. En una realización específica, el trastorno metabólico es un trastorno hiperglucémico. En otra realización, el trastorno metabólico es una diabetes.
- 20 En otra realización, el sujeto es un animal o un ser humano.
- En el contexto de la invención, debe entenderse que las referencias a métodos de tratamiento y prevención se refieren a los variantes de FGF19 de la invención para su uso en dichos métodos. Por consiguiente, debe entenderse que los aspectos y las realizaciones relacionadas con los métodos de tratamiento o prevención se refieren a un variante de FGF19 para su uso en el sentido anterior.
- 25 Los usos o métodos de tratamiento de un sujeto descritos en la presente están previstos para provocar o provocan unos niveles reducidos de glucosa, un aumento en la sensibilidad a la insulina, una menor resistencia a la insulina, una menor cantidad de glucagón, una mejora en la tolerancia a la glucosa o del metabolismo u homeostasis de la glucosa, una mejor función pancreática, o unos niveles reducidos de triglicéridos, colesterol, lipoproteínas de densidad intermedia ("intermediate density lipoproteins", IDL), lipoproteínas de baja densidad ("low density lipoproteins", LDL) o lipoproteínas de muy baja densidad ("very low density lipoproteins", VLDL), o una disminución en la presión sanguínea, una disminución en el espesor íntimo de los vasos sanguíneos, o una disminución en la masa corporal o la ganancia de peso.
- 30 La presente descripción contempla un método para determinar si un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19, comprendiendo dicho método a) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un variante de FGF19 al sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y b) determinar si se observa un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio; en el que la ausencia de un indicio de un trastorno canceroso indica que el sujeto de estudio es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19.
- 35 Tal como se emplea en la presente, la expresión "sustituto de FGF19" pretende incluir cualquier molécula (por ejemplo, un polipéptido) capaz de suscitar el mismo efecto, o un efecto comparable, que el FGF19, en el que el efecto en general está relacionado con el cáncer (por ejemplo, la inducción de la formación de un tumor o cualquier otro indicio de un trastorno canceroso). Con frecuencia, un sustituto de FGF19 es un variante de FGF19, que incluye fragmentos activos que presentan al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con un tramo contiguo de aproximadamente 150 aminoácidos a aproximadamente 160 aminoácidos, de aproximadamente 160 aminoácidos a aproximadamente 170 aminoácidos, de aproximadamente 170 aminoácidos a aproximadamente 180 aminoácidos, de aproximadamente 180 aminoácidos a aproximadamente 190 aminoácidos, o aproximadamente 194 aminoácidos o más de una de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente.
- 45 En la presente descripción, la expresión "un indicio de un trastorno canceroso" se refiere, de forma amplia, a cualquier indicación de que una enfermedad, una afección o un trastorno canceroso se ha formado, está formándose
- 50

o es probable que se forme. La mayoría de los cánceres se detectan inicialmente debido a la aparición de señales o síntomas o a través de una selección. El diagnóstico definitivo en general requiere, entre otros medios, de uno o más de un examen patológico de una muestra de tejido, ensayos sanguíneos, rayos X, barridos CT y endoscopia. Los trastornos cancerosos pueden referirse a cualquier tipo o clasificación del cáncer, que incluye carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias, y blastomas.

Los síntomas del cáncer a menudo son provocados por el efecto de un cáncer sobre la parte del cuerpo en que se está formado (por ejemplo, bultos inusuales en las mamas o cambios en lunares de la piel), aunque las enfermedades, afecciones y/o trastornos cancerosos pueden provocar síntomas más generales, tales como pérdida de peso o fatiga. En los métodos y modelos descritos en la presente, un indicio de un trastorno (o enfermedad o afección) canceroso es, con frecuencia, un tumor (por ejemplo, un tumor de colon o un tumor hepático). Las observaciones y mediciones de una reducción en el número de tumores, el tamaño del tumor o el peso del tumor indican, con frecuencia, que una modalidad de tratamiento está teniendo un efecto positivo.

En casos concretos, el indicio o indicios de un trastorno canceroso están asociados con el carcinoma hepatocelular carcinoma (HCC, también denominado hepatoma maligno), el tipo más habitual de cáncer de hígado. El HCC puede presentarse con ictericia, hinchamiento por fluido de ascitis, facilidad de formación de hematomas por anomalías en la coagulación de la sangre, pérdida de apetito, pérdida de peso, dolor abdominal, náuseas, emesis o fatiga. El HCC se analiza con más detalle a continuación.

La presente descripción contempla un método para determinar si un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19, comprendiendo dicho método a) proporcionar un sujeto de estudio que presenta un indicio de un trastorno canceroso, y el sujeto padece un trastorno metabólico, b) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un variante de FGF19 al sujeto de estudio, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y c) determinar si un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio se incrementa; en el que la ausencia de incremento de un indicio de un trastorno canceroso indica que el sujeto de estudio es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19.

La presente descripción contempla un método para determinar si un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19, comprendiendo dicho método a) proporcionar un sujeto de estudio que presenta un indicio de un trastorno canceroso, y el sujeto de estudio padece un trastorno metabólico, b) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un variante de FGF19 al sujeto de estudio, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y c) determinar si un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio se reduce; en el que la reducción de un indicio de un trastorno canceroso indica que el sujeto de estudio es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19.

La presente descripción también contempla un método para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para tratar un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho método coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y el variante de FGF19 al sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y determinar si se observa un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio; en el que la ausencia de un indicio de un trastorno canceroso indica que el variante de FGF19 es un candidato para el tratamiento del sujeto de estudio.

La presente descripción también contempla un método para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para tratar un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho método proporcionar un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, y dicho sujeto de estudio presenta un indicio de un trastorno canceroso, coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un variante de FGF19 al sujeto de estudio, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para exacerbar un trastorno canceroso en una población de referencia, y determinar si un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio se incrementa; en el que la ausencia de exacerbación de un indicio de un trastorno canceroso indica que el variante de FGF19 es un candidato para el tratamiento del sujeto de estudio. En casos concretos, uno o más indicios de un trastorno canceroso se reducen en el sujeto de estudio.

En algunas realizaciones, la presente descripción contempla un método para tratar (o prevenir, en ciertas circunstancias) un cáncer o tumor dependiente de FGF19 en un sujeto que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho método proporcionar un sujeto que padece un trastorno metabólico, en el que el sujeto muestra un indicio de un trastorno canceroso inducido por FGF19, y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19 identificado a partir de una agrupación de polipéptidos de variantes de FGF19 candidatos, según se describe en la presente; en el que se produce una mejora en el trastorno metabólico en el sujeto.

Tal como se mencionó anteriormente, la presente descripción también contempla diversos modelos. Un modelo concreto es para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para prevenir una enfermedad, una afección o un trastorno canceroso en un sujeto que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho modelo un sujeto

que i) no muestra un indicio de un trastorno canceroso antes de la administración de una cantidad eficaz de FGF19 o un sustituto de FGF19, y ii) muestra un indicio de un trastorno canceroso después de la administración de FGF19 o un sustituto de FGF19; y en el que un indicio de un trastorno canceroso mejora tras la administración de una cantidad eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1. En ciertos casos, el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.

La presente descripción también contempla un modelo para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para tratar una enfermedad, una afección o un trastorno canceroso en un sujeto que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho modelo un sujeto que presenta al menos un indicio de cáncer que surge de la administración de FGF19 o un sustituto de FGF19, en el que el indicio de cáncer mejora tras la administración de una cantidad eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1. En ciertos casos, el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.

Aunque no es limitante, en ciertos casos, el variante de FGF19 es M70 (SEQ ID NO:1) en los métodos y modelos de la presente descripción. Un variante de FGF19 puede identificarse a partir de una agrupación de polipéptidos de variantes de FGF19 candidatos, en el que un variante de FGF19 identificado mejora al menos un trastorno, por ejemplo, un trastorno hiperglucémico (por ejemplo, diabetes), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico, obesidad o una masa corporal no deseable. Otros ejemplos de enfermedades, afecciones y trastornos metabólicos se describen a continuación.

En ciertas realizaciones de los métodos y modelos descritos en la presente, el sujeto (por ejemplo, un sujeto de estudio) es un animal (por ejemplo, un roedor o un mono), tal como un ratón (por ejemplo, un ratón *db/db*). Dependiendo del contexto en que el término se utilice, un sujeto también puede ser un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto presenta un nivel mayor de FGF19 maduro, comparado con el nivel de FGF19 maduro en una población de muestra, en la que la población de muestra puede ser cualquier grupo de miembros útiles como línea de base, referencia, etc. En algunas realizaciones, el nivel mayor de FGF19 maduro es debido a la sobreexpresión.

En algunas realizaciones, el variante de FGF19 se marca, por ejemplo, para facilitar la detección, la purificación y similares. En ciertas realizaciones, el variante de FGF19 se marca a través de un enlace covalente. Los expertos en la técnica están familiarizados con diferentes tipos de marcadores y sus usos. El marcaje se realiza con más frecuencia en el N-terminal y/o C-terminal de un polipéptido, pero también puede producirse dentro del polipéptido. La presente descripción contempla el uso de cualquier técnica de marcaje directo o indirecto, que puede realizarse *in vivo*, *in vitro*, etc.

En los métodos y modelos de la presente descripción, las etapas asociadas con la determinación de un indicio de una enfermedad, una afección o un trastorno canceroso pueden realizarse en cualquier momento en que la enfermedad, la afección o el trastorno canceroso se manifieste y, por tanto, pueda detectarse. Como ejemplo, la determinación puede producirse más de 3 meses, más de 20 semanas, más de 6 meses, más de 9 meses o más de 12 meses después de las etapas de coadministración mencionadas anteriormente. En casos concretos, FGF19 se coadministra con el variante de FGF19.

La presente descripción también contempla un método para antagonizar la actividad oncogénica de FGF19. En ciertas realizaciones, en la presente se proporciona un variante de FGF19 para su uso en un método para tratar un cáncer o tumor dependiente de FGF19 por medio de antagonizar la actividad oncogénica de FGF19 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19, antagonizando con ello la actividad oncogénica de FGF19 en el sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto padece una enfermedad metabólica y/o presenta un indicio de un trastorno canceroso.

La presente descripción contempla además un método para prevenir o tratar un cáncer o tumor dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19, en el que el cáncer o tumor en el sujeto es prevenido o tratado. En ciertas realizaciones, se produce una mejora en cáncer o tumor, o en uno de sus síntomas, en el sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto padece una enfermedad metabólica y/o presenta un indicio de un trastorno canceroso. En algunas realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de hígado. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de colon. En otras realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de próstata. En otras realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de pulmón. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto que necesita de prevención o tratamiento. El variante de FGF19 de la invención es un polipéptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1 (M70).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos del FGF19 humano maduro. Los restos aminoácidos correspondientes al epitopo flag están subrayados.

La figura 2 muestra las concentraciones de FGF19 en plasma determinadas mediante ELISA en ratones *db/db* cinco semanas después del transporte de genes mediado por AAV (GFP como control, FGF19 y/o M70).

La figura 3 muestra la formación de nódulos de tumores hepáticos patentes en ratones *db/db* tras una exposición continua a GFP, FGF19-flag y/o M70 veinticuatro semanas después del transporte de genes mediado por AAV.

La figura 4 muestra el efecto del peso corporal, medido antes de la inyección y 3, 5 y 23 semanas después de la inyección, en ratones *db/db* tras una exposición continua a GFP, FGF19-flag y/o M70 después del transporte de genes mediado por AAV.

La figura 5 muestra el efecto de la concentración de glucosa, medida antes de la inyección y 3, 5 y 23 semanas después de la inyección, en ratones *db/db* tras una exposición continua a GFP, FGF19-flag y/o M70 después del transporte de genes mediado por AAV.

Las figuras 6A-6E muestran el sistema de transgenes mediado por AAV para estudiar la tumorigénesis hepatocelular. (A) Un diagrama del protocolo experimental. Los ratones recibieron una única inyección de 3×10^{11} copias del genoma de AAV-FGF19 a través de la vena de la cola cuando tenían 6-12 semanas de edad. Los ratones se sacrificaron 24 o 52 semanas después para el análisis de tumores hepáticos. ITR, repetición terminal invertida ("inverted terminal repeat"); EF1a, promotor del factor de alargamiento 1 α . (B) Hígados representativos de ratones *db/db* 24 semanas después de la administración de AAV-FGF19. Se observaron múltiples tumores grandes y alzados que sobresalen de la superficie hepática en ratones *db/db* que expresan FGF19. No se observaron tumores hepáticos en animales inyectados con un virus control (AAV-GFP) en este experimento. Barras de escala, 10 mm. (C) Los niveles en suero de FGF19 se midieron mediante ELISA a las 1, 4, 12 y 24 semanas después de la administración de AAV en ratones *db/db* (n = 5). Todos los valores representan el promedio \pm EEP. (D) Multiplicidad del tumor hepático, tamaño y puntuación en ratones *db/db* que expresan el transgén FGF19. Se contaron los tumores por hígado y se midieron los tamaños tumorales máximos. El promedio en cada grupo se indica mediante líneas horizontales (n = 15 por grupo, cada punto representa un animal individual). Todos los valores representan el promedio \pm EEP. ***p<0,001, *p<0,05 indican diferencias significativas frente al grupo control mediante el ensayo de la t de dos colas. (E) Caracterización histológica e inmunohistoquímica de tumores hepáticos inducidos por FGF19 en ratones *db/db*. Las columnas son, de arriba a abajo: tinción con hematoxilina y eosina (H & E) de secciones de hígado; detección inmunohistoquímica de Ki-67, PCNA, glutamina sintetasa, y β -catenina. Las células neoplásicas inducidas por FGF19 son fuertemente positivas a glutamina sintetasa. Los tumores (T) están perfilados por líneas punteadas. Barras de escala, 100 μ m.

Las figuras 7A-7H demuestran que M70 es un variante de FGF19 que no provoca tumores después de una exposición continua en ratones *db/db* durante 24 semanas. (A) Alineamiento de las secuencias de proteínas de M70 y FGF19 en la región N-terminal. Las mutaciones introducidas en M70 están subrayadas. (B)-(F) Número de tumores por hígado (B), peso del hígado (C), y proporción de peso del hígado al cuerpo (D) de ratones *db/db* que expresan FGF19 o M70 durante 24 semanas (n = 5 por grupo). También se determinaron la curva de crecimiento (E) y los niveles en suero de expresión de transgenes (F). (G) Secciones de hígado representativas procedentes de ratones *db/db* después de 24 semanas de expresión de los transgenes. Las columnas del panel del hígado son, de arriba a abajo: tinción con hematoxilina y eosina (H & E) de secciones de tejido de hígado; detección inmunohistoquímica de Ki-67 y glutamina sintetasa. Los tumores (T) están perfilados por líneas punteadas. Barras de escala, 100 μ m. (H) Se midieron los niveles en suero de enzimas hepáticas (ALPK: fosfatasa alcalina; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; n = 5 por grupo) antes de terminar el estudio. Todos los valores representan el promedio \pm EEP. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 indican diferencias significativas frente al grupo control mediante un ANOVA de una vía, seguido de un ensayo de Dunnett. Véanse también las tablas 3 y 4.

Las figuras 8A-8G demuestran que no se forman tumores hepáticos en ratones *rasH2* tratados con M70 durante 52 semanas. (A)-(E) Curva de crecimiento (A), número de tumores por hígado (B), peso del hígado (C), proporciones de peso del hígado al peso del cuerpo (D), y niveles en suero de M70 o FGF19 (E) de ratones *rasH2* que expresan los transgenes de FGF19 o M70 (n = 9 por grupo) durante 52 semanas. (F) Los hígados se recolectaron 52 semanas después de la administración de AAV y se tiñeron con H & E o con anti-glutamina sintetasa, un marcador para los tumores hepáticos inducidos por FGF19. Las secciones teñidas para la glutamina sintetasa se tomaron de un área cerca de la sección apareada teñida con H & E, y muestran las mismas venas porta (p) y central (c). Los tumores (T) están perfilados por líneas punteadas. Barras de escala, 100 μ m. (G) Análisis de qRT-PCR de la expresión de Ki-67 y AFP en el hígado. La abundancia de ARNm se normalizó a la expresión de GAPDH. Todos los valores representan el promedio \pm EEP. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 indican diferencias significativas frente al grupo control mediante un ANOVA de una vía, seguido de un ensayo de Dunnett.

Las figuras 9A-9G muestran la unión de M70 y la activación de FGFR4 *in vitro*. (A) Ensayo Biacore SPR de la interacción entre proteínas quiméricas de FGF19 y FGFR4-Fc inmovilizadas sobre células de flujo. La columna de la izquierda muestra las curvas de unión obtenidas a través de un intervalo de concentraciones de FGF19 (15,62-2000 nM en diluciones en 2 veces), mientras que la columna de la derecha muestra los ajustes de estado estacionario de los datos para obtener los valores de K_D . (B) Unión de M70 a FGFR4 mediante Biacore. Se emplearon procedimientos similares a (A). (C) Unión en fase sólida de M70 o FGF19 al complejo de receptor FGFR4-KLB. Los ligandos unidos se detectaron usando un anticuerpo policlonal específico de FGF19 biotinilado. (D) Actividad luciferasa relativa después de una estimulación con M70 o FGF19 en células L6 transfectadas de modo transitorio con FGFR4 en presencia o ausencia de KLB. (E) M70 induce la fosforilación de ERK en células Hep3B. (F) M70 reprime la expresión de *Cyp7a1* en hepatocitos primarios con un origen de ratón, rata y ser humano. Se determinó la

expresión relativa de ARNm de Cyp7a1 en hepatocitos mediante qRT-PCR, y se normalizó a los niveles de ARN 18S (ratón y rata) o ARNm de actina (humana). (G) Represión de la expresión de Cyp7a1 hepática por M70 en ratones. Ratones *db/db* de 12 semanas de edad recibieron una inyección intraperitoneal de proteína de M70 o FGF19 recombinante. Los ratones recibieron la eutanasia 4 horas después de la dosificación, y se evaluó la expresión de Cyp7a1 hepática mediante qRT-PCR y se normalizó a la expresión de ARN 18S. Se muestran las curvas de dosis-respuesta de la represión de Cyp7a1 en ratones. Todos los valores representan el promedio \pm EEP.

Las figuras 10A-10C muestran la activación diferente de las vías de señalización celular por M70 y FGF19 *in vivo*. (A) Se recolectaron los hígados de ratones *db/db* ($n = 6$ por grupo) a los que se les había inyectado por vía intraperitoneal disolución salina, proteínas de FGF19 1 mg/kg o de M70 1 mg/kg 2 horas tras la inyección. Los lisados de los hígados se estudiaron mediante transferencia Western para la expresión y la fosforilación de las proteínas indicadas. Cada carril representa un ratón individual. Rab11 actúa como control de carga. Nótese que la STAT3 hepática es activada por FGF19, pero no por M70. (B) Ratones tratados con FGF19 muestran una expresión elevada de IL-6 (un inductor de STAT3). Se recolectaron los hígados de ratones *db/db* como en (A). Se midieron las cantidades de ARNm de IL-6 en los hígados mediante qRT-PCR y se normalizaron a la expresión de GAPDH. Los resultados se representan como expresión en número de veces con relación a los animales tratados con disolución salina. Se muestran los resultados para 5 ratones distintos por condición. En el panel inferior se muestra el estado de fosforilación de STAT3 mediante inmunotransferencia de los lisados de los hígados procedentes de los mismos animales. (C) Una qPCR que muestra la expresión de ARNm de genes diana de STAT3 (survivina, Bcl-X_L, y ciclina D1) en ratones *rash2* 52 semanas después de la administración de vectores AAV que expresan los transgenes FGF19 o M70. Todos los valores representan el promedio \pm EEP. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indican diferencias significativas frente al grupo control mediante un ANOVA de una vía, seguido de un ensayo de Dunnett.

Las figuras 11A-11J demuestran que M70 inhibe el crecimiento tumoral inducido por FGF19 en ratones *db/db* y en modelos de xenoinjerto. (A)-(D) Ratones *db/db* de 11 semanas de edad fueron inyectados con AAV-FGF19 (3×10^{10} copias del genoma) en ausencia o en presencia de M70 (3×10^{11} copias del genoma). Se determinaron la puntuación de tumor hepático (A), peso del hígado (B), proporción de peso del hígado a peso corporal (C) y los niveles en suero de la expresión de los transgenes (D) 24 semanas después. * $p < 0,05$ indica diferencias significativas frente al grupo control mediante un ANOVA de una vía, seguido de un ensayo de Dunnett; ### $p < 0,01$ indica diferencias significativas mediante un ensayo de la *t* de dos colas. (E) Histología de hígados de ratones que expresan FGF19 o cotratados con M70. Se tiñeron secciones de hígado con H & E o anti-glutamina sintetasa, un marcador para los tumores hepáticos inducidos por FGF19. Los tumores (T) están perfilados por líneas punteadas. Barras de escala, 100 μ m. (F) Líneas de células de cáncer humanas producen y segregan FGF19. Se determinan los niveles de FGF19 en sobrenadantes de cultivos mediante ELISA. (G-J) El M70 inhibe el crecimiento de tumores de xenoinjertos de cáncer humano *in vivo*. Ratones *nu/nu* atímicos de 8 semanas de edad fueron implantados por vía subcutánea con 5×10^6 células Huh-7 ($n = 10$) (G) o HCT-116 ($n = 5$) (H-J). Los ratones que portan tumores establecidos con volúmenes equivalentes (aproximadamente 100 mm³) se aleatorizaron en grupos y se trataron con M70 mediante transporte de genes mediado por AAV. También se incluyó un virus control (GFP) en el estudio. El crecimiento tumoral se midió a lo largo del periodo de tratamiento de 15 días. La imagen muestra tumores sólidos HCT-116 diseccionados al final del periodo de tratamiento de 15 días (I). También se determinó la ganancia de peso corporal de ratones que portan xenoinjertos de tumor HCT-116 (J). *** $p < 0,001$ indica diferencias significativas frente al grupo control mediante un ANOVA de una vía, seguido de un ensayo de Bonferroni. Todos los valores representan el promedio \pm EEP.

Las figuras 12A-12B muestran un modelo para desarrollar un variante de FGF19 para tratar tumores dependientes de FGF19. (A) Las lesiones hepáticas crónicas (colestasis, cirrosis, etc.) conducen a la acumulación de FGF19 en el hígado. Aunque es importante para regular la síntesis de ácido biliar, el FGF19 también activa STAT3, un factor de transcripción crucial en la estimulación de la hepatocarcinogénesis. Esto contribuye al inicio y estimulación de tumores y a su avance hacia HCC. (B) El M70 es un variante modificado de FGF19. Como modulador selectivo, M70 muestra un sesgo hacia ciertas vías de señalización de FGFR4 (concretamente, pERK y Cyp7a1) con la exclusión relativa de otras (concretamente, tumor). Además, M70 puede inhibir el crecimiento de tumores que dependen de FGF19.

Las figuras 13A-13B demuestran que M70 retrasa el crecimiento tumoral en un modelo de ratón singénico de cáncer de colon CT26. (A) El M70 retrasa el crecimiento de tumores CT26 tras la administración de dosis de 10 mg/kg. (B) El M70 retrasa el crecimiento de tumores CT26 tras la administración de dosis de 3 mg/kg. Los valores de *p* se determinaron mediante un ANOVA de dos vías frente a ratones tratados con vehículo. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Las figuras 14A-14B demuestran que M70 reduce el peso corporal en un modelo de ratón singénico de cáncer de colon CT26. (A) El M70 reduce el peso corporal tras la administración de dosis de 10 mg/kg. (B) El M70 reduce el peso corporal tras la administración de dosis de 3 mg/kg. Los valores de *p* se determinaron mediante un ANOVA de dos vías frente a ratones tratados con vehículo. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Descripción detallada

Antes de describir más a fondo la presente descripción, debe entenderse que la descripción no se limita a las realizaciones concretas ofrecidas en la presente, y también debe entenderse que la terminología usada en la

presente tiene el objetivo de describir tan solo las realizaciones concretas y no pretende ser limitante.

Generalidades

- La presente descripción contempla la identificación de agentes, y sus composiciones, usando los modelos y los métodos descritos en la presente. Los modelos y los métodos asociados proporcionan una metodología precisa y eficaz para la identificación de agentes que no inducen trastornos cancerosos (por ejemplo, carcinoma hepatocelular). Los modelos y los métodos proporcionados en la presente son útiles para identificar agentes que antagonizan la actividad oncogénica de FGF19. En ciertas realizaciones, estos agentes poseen utilidad terapéutica en el tratamiento y/o la prevención de diversas enfermedades, afecciones y trastornos y/o de sus síntomas que pertenecen, por ejemplo, a los trastornos del metabolismo de la glucosa y/o a los trastornos del peso corporal. Como ejemplo, pero no como limitación, los agentes y sus composiciones pueden usarse para el tratamiento y/o la prevención de la diabetes de tipo 2, de la resistencia a la insulina y de enfermedades, afecciones y trastornos que se caracterizan por una resistencia a la insulina, una menor producción de insulina, hiperglucemia, síndrome metabólico u obesidad. Estos agentes también son útiles para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, una afección o un trastorno dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas.
- Los modelos y los métodos asociados descritos en la presente son útiles para identificar agentes (por ejemplo, polipéptidos y anticuerpos) que no inducen ni exacerban los efectos relacionados con el cáncer de FGF19 (por ejemplo, HCC). Tal como se describe en detalle a continuación, la presente descripción contempla el uso de los modelos y los métodos para determinar si un polipéptido de variante de FGF19 que tiene unas características metabólicas favorables también posee un perfil "relacionado con el cáncer" deseable. También se proporcionan métodos para antagonizar la actividad oncogénica de FGF19 en un sujeto y, en ciertas realizaciones, métodos para prevenir o tratar una enfermedad, una afección o un trastorno dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas. En ciertas realizaciones, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor, tal como cáncer o tumor de hígado, colon, próstata o pulmón.

Definiciones

- Los términos "paciente" o "sujeto" se utilizan de modo intercambiable para indicar un ser humano o un animal no humano (por ejemplo, un mamífero).

- Los términos "tratar", "tratamiento" y similares se refieren a una línea de actuación (tal como administrar un polipéptido o una composición farmacéutica que comprende un polipéptido) iniciada después de que una enfermedad, una afección o un trastorno, o uno de sus síntomas, haya sido diagnosticado, observado y similares, para eliminar, reducir, suprimir, mitigar o mejorar, de manera temporal o permanente, al menos una de las causas subyacentes de una enfermedad, una afección o un trastorno que aflige a un sujeto, o al menos uno de los síntomas asociados con una enfermedad, una afección o un trastorno que aflige al sujeto. Así, el tratamiento incluye inhibir (es decir, detener el desarrollo o el desarrollo posterior de la enfermedad, la afección o el trastorno o de sus síntomas clínicos asociados) una enfermedad activa (por ejemplo, para disminuir el nivel de insulina y/o glucosa en la corriente sanguínea, para aumentar la tolerancia a la glucosa para minimizar la fluctuación de los niveles de glucosa y/o para proteger frente a enfermedades provocadas por la alteración de la homeostasis de la glucosa).

La expresión "que necesita tratamiento", tal como se emplea en la presente, se refiere a una opinión emitida por un médico u otro profesional sanitario que refleja que un sujeto requiere o se beneficiaría de un tratamiento.

- Los términos "prevenir", "prevención" y similares se refieren a una línea de actuación (tal como administrar un polipéptido o una composición farmacéutica que comprende un polipéptido) iniciada de tal manera (por ejemplo, antes de la aparición de una enfermedad, una afección o un trastorno, o de uno de sus síntomas) que previene, suprime, inhibe o reduce, de manera temporal o permanente, el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad, una afección, un trastorno o similares (según se determina, por ejemplo, por la ausencia de síntomas clínicos) o que retrasa su aparición, en general en el contexto de un sujeto predispuesto a padecer una enfermedad, una afección o un trastorno concretos. En ciertos casos, los términos también se refieren a frenar el avance de una enfermedad, una afección o un trastorno, o inhibir su avance hasta un estado perjudicial o por lo demás no deseado.

La expresión "que necesita prevención", tal como se emplea en la presente, se refiere a una opinión emitida por un médico u otro profesional sanitario que refleja que un sujeto requiere o se beneficiaría de una cura preventiva.

- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la administración de un agente a un sujeto, por sí solo o como parte de una composición farmacéutica, y en una dosis única o como parte de una serie de dosis, en una cantidad que es capaz de provocar cualquier efecto positivo y detectable sobre cualquier síntoma, aspecto o característica de una enfermedad, una afección o un trastorno cuando se administra a un paciente. La cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse midiendo efectos fisiológicos pertinentes. En el caso de un trastorno hiperglucémico, puede usarse la disminución o la reducción de la glucosa en sangre o una mejora en el ensayo de tolerancia a la glucosa para determinar si la cantidad de un agente es eficaz para tratar el trastorno hiperglucémico. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para reducir o disminuir cualquier nivel (por ejemplo, un nivel de línea de base) de la glucosa en plasma en ayunas ("fasting plasma glucose", FPG), en la

que, por ejemplo, la cantidad es suficiente para reducir un nivel de FPG mayor que 200 mg/dl a un nivel menor que 200 mg/dl, en la que la cantidad es suficiente para reducir un nivel de FPG entre 175 mg/dl y 200 mg/dl a un nivel menor que el nivel inicial, en la que la cantidad es suficiente para reducir un nivel de FPG entre 150 mg/dl y 175 mg/dl a un nivel menor que el nivel inicial, en la que la cantidad es suficiente para reducir un nivel de FPG entre 125 mg/dl y 150 mg/dl a un nivel menor que el nivel inicial, etc. (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.). Además, en el caso de los niveles de HbA1c, la cantidad eficaz es una cantidad suficiente para reducir o disminuir los niveles en más de aproximadamente 10% al 9%, más de aproximadamente 9% al 8%, más de aproximadamente 8% al 7%, más de aproximadamente 7% al 6%, más de aproximadamente 6% al 5%, etc. Más en concreto, la presente descripción contempla una reducción o disminución de los niveles de HbA1c en 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. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ajustarse en conexión con el régimen de dosificación y los análisis de diagnóstico del trastorno del sujeto y similares.

La expresión “en una cantidad suficiente para provocar un cambio” significa que existe una diferencia detectable entre un nivel de un indicador medido antes (por ejemplo, un nivel de línea de base) y después de la administración de una terapia concreta. Los indicadores incluirán cualquier parámetro objetivo (por ejemplo, nivel de glucosa o insulina) o un parámetro subjetivo (por ejemplo, la sensación de bienestar de un sujeto).

La expresión “tolerancia a la glucosa”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la capacidad de un sujeto para controlar el nivel de glucosa en plasma y/o de insulina en plasma cuando la ingesta de glucosa fluctúa. Por ejemplo, la tolerancia a la glucosa incluye la capacidad del sujeto para reducir, en aproximadamente 120 minutos, el nivel de glucosa en plasma hasta un nivel determinado antes de la ingesta de glucosa.

En un sentido general, los términos “diabetes” y “diabético” se refieren a una enfermedad progresiva del metabolismo de carbohidratos que implica una producción o utilización inadecuadas de insulina, con frecuencia caracterizada por hiperglucemia y glicosuria. Los términos “prediabetes” y “prediabético” se refieren a un estado en el que un sujeto no presenta las características, síntomas y similares que se observan generalmente en la diabetes, pero sí presenta las características, síntomas y similares que, si no se tratasen, podrían acabar provocando diabetes. La presencia de estas condiciones puede determinarse, por ejemplo, usando el ensayo de la glucosa en plasma en ayunas (FPG) o el ensayo de tolerancia a la glucosa oral (“oral glucose tolerance test”, OGTT). Ambos normalmente requieren que un sujeto se quede en ayunas durante al menos 8 horas antes de iniciar el ensayo. En el ensayo de FPG, se mide la glucosa en sangre de un sujeto después de finalizar el ayuno; en general, el sujeto ayuna durante la noche y la glucosa en sangre se mide por la mañana antes de que el sujeto coma. Un sujeto sano tendría, en general, una concentración de FPG de entre aproximadamente 90 y aproximadamente 100 mg/dl, un sujeto con “prediabetes” tendría, en general, una concentración de FPG de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 125 mg/dl, y un sujeto con “diabetes” tendría, en general, un nivel de FPG mayor que aproximadamente 126 mg/dl. En el OGTT, la glucosa en sangre de un sujeto se mide después de un ayuno y de nuevo dos horas después de beber un líquido rico en glucosa. Dos horas después de consumir el líquido rico en glucosa, un sujeto sano tiene, en general, una concentración de glucosa en sangre menor que aproximadamente 140 mg/dl, un sujeto prediabético tiene, en general, una concentración de glucosa en sangre de aproximadamente 140 a aproximadamente 199 mg/dl, y un sujeto diabético tiene, en general, una concentración de glucosa en sangre de aproximadamente 200 mg/dl o mayor. Aunque los valores glucémicos mencionados anteriormente se refieren a sujetos humanos, la normoglucemia, la hiperglucemia moderada y la hiperglucemia obvia se escalan de forma diferente en sujetos murinos. Un sujeto murino sano, después de un ayuno de cuatro horas, tendría, en general, una concentración de FPG de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 150 mg/dl, un sujeto murino con “prediabetes” tendría, en general, una concentración de FPG de entre aproximadamente 175 y aproximadamente 250 mg/dl, y un sujeto murino con “diabetes” tendría, en general, una concentración de FPG mayor que aproximadamente 250 mg/dl.

La expresión “resistencia a la insulina”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un trastorno en el que una cantidad normal de insulina es incapaz de producir una respuesta fisiológica o molecular normal. En algunos casos, una cantidad hiperfisiológica de insulina, producida de modo endógeno o administrada de modo exógeno, es capaz de superar la resistencia a la insulina, total o parcialmente, y producir una respuesta biológica.

La expresión “síndrome metabólico” se refiere a un grupo de rasgos asociados que incluyen, pero no se limitan a hiperinsulinemia, tolerancia a la glucosa anómala, obesidad, redistribución de la grasa hacia el compartimento abdominal o de la parte superior del cuerpo, hipertensión, disfibrinólisis, y dislipidemia caracterizada por una cantidad alta de triglicéridos, una cantidad alta de lipoproteínas de alta densidad (HDL)-colesterol, y una cantidad alta de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los sujetos que presentan síndrome metabólico están en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2 y/u otros trastornos (por ejemplo, aterosclerosis).

La expresión “trastorno del metabolismo de la glucosa” incluye cualquier trastorno que se caracteriza por un síntoma clínico o una combinación de síntomas clínicos que están asociados con un nivel elevado de glucosa y/o un nivel elevado de insulina en un sujeto, con relación a un individuo sano. Unos niveles elevados de glucosa y/o insulina pueden manifestarse en las siguientes enfermedades, afecciones o trastornos: hiperglucemia, diabetes de tipo II, diabetes gestacional, diabetes de tipo I, resistencia a la insulina, tolerancia alterada a la glucosa, hiperinsulinemia,

metabolismo de la glucosa alterado, prediabetes, otros trastornos metabólicos (tales como síndrome metabólico, que también se denomina síndrome X), y obesidad, entre otros. Los polipéptidos de la presente descripción, y sus composiciones, pueden usarse, por ejemplo, para lograr y/o mantener la homeostasis de la glucosa, por ejemplo, para reducir el nivel de glucosa en la corriente sanguínea y/o para reducir el nivel de insulina hasta el intervalo que se encuentra en un sujeto sano.

El término “hiperglucemia”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un trastorno en el que una cantidad elevada de glucosa circula en el plasma sanguíneo de un sujeto, con relación a un individuo sano. La hiperglucemia puede diagnosticarse usando métodos conocidos en la técnica, que incluyen la medición de los niveles de glucosa en sangre en ayunas, tal como se describe en la presente.

El término “hiperinsulinemia”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un trastorno en el que existen niveles elevados de insulina en la circulación y, al mismo tiempo, los niveles de glucosa en sangre son elevados o normales. La hiperinsulinemia puede ser provocada por la resistencia a la insulina, que está asociada con la dislipidemia, tal como un alta cantidad de triglicéridos, una alta cantidad de colesterol, una alta cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y una baja cantidad de lipoproteínas de alta densidad (HDL); altos niveles de ácido úrico; síndrome del ovario poliquístico; diabetes de tipo II; y obesidad. La hiperinsulinemia puede diagnosticarse como un nivel de insulina en plasma mayor que aproximadamente 2 $\mu\text{U/ml}$.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “trastorno del peso corporal” se refiere a trastornos asociados con un peso corporal excesivo y/o un mayor apetito. Se emplean diversos parámetros para determinar si un sujeto tiene sobrepeso, comparado con un individuo sano de referencia, que incluye la edad, la altura, el sexo y el estado de salud del sujeto. Por ejemplo, puede considerarse que un sujeto tiene sobrepeso o es obeso evaluando el índice de masa corporal (“Body Mass Index”, BMI) del sujeto, que se calcula dividiendo el peso del sujeto en kilogramos entre la altura del sujeto en metros al cuadrado. Un adulto que tiene un BMI en el intervalo de aproximadamente 18,5 a aproximadamente 24,9 kg/m^2 se considera que tiene un peso normal; un adulto que tiene un BMI entre aproximadamente 25 y aproximadamente 29,9 kg/m^2 puede considerarse con sobrepeso (preobeso); y un adulto que tiene un BMI de aproximadamente 30 kg/m^2 o mayor puede considerarse obeso. Un mayor apetito con frecuencia contribuye a un excesivo peso corporal. Existen varios trastornos asociados con un mayor apetito que incluyen, por ejemplo, el síndrome de alimentación nocturna, que se caracteriza por mostrar anorexia por la mañana y polifagia por la noche, a menudo asociado con insomnio, pero que puede estar relacionado con lesiones en el hipotálamo.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína”, que se emplean de modo intercambiable en la presente, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados genéticamente y no codificados genéticamente, derivatizados o modificados de modo químico o bioquímico, y polipéptidos que presentan esqueletos polipeptídicos modificados. Los términos incluyen proteínas de fusión que incluyen, pero no se limitan a proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, proteínas de fusión con secuencias conductoras heterólogas y homólogas, con o sin restos metionina N-terminales, proteínas marcadas de modo inmunológico y similares. Se apreciará que a través de esta descripción, los aminoácidos se indican según los códigos de una sola letra o de tres letras.

Tal como se emplea en la presente, el término “variante” incluye variantes naturales (por ejemplo, homólogos y variantes alélicas) y variantes no naturales (por ejemplo, muteínas). Los variantes naturales incluyen homólogos, es decir, ácidos nucleicos y polipéptidos que se diferencian en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, de una especie a otra. Los variantes naturales incluyen variantes alélicas, es decir, ácidos nucleicos y polipéptidos que se diferencian en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, de un individuo a otro dentro de una especie. Los variantes no naturales incluyen ácidos nucleicos y polipéptidos que comprenden un cambio en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente, en el que el cambio en la secuencia se introduce de modo artificial, por ejemplo, el cambio se genera en el laboratorio o en otras instalaciones por medio de la intervención humana (“la mano humana”).

El término “nativo”, con referencia a FGF19, se refiere al FGF19 natural biológicamente activo, que incluye los variantes de FGF19 naturales biológicamente activos. El término incluye la secuencia madura de FGF19 humano de 194 aminoácidos.

Los términos “marcador”, “marcar” y similares, cuando se emplean en el contexto de un polipéptido o un ácido nucleico (o un anticuerpo, según sea apropiado) de la presente descripción se refieren, en un sentido amplio, a cualquier medio útil, por ejemplo, en la purificación, la identificación, el aislamiento y la síntesis de polipéptidos. Los marcadores en general se unen de modo covalente al polipéptido de interés y pueden introducirse de cualquier manera conocida en la técnica, que incluye la unión a un polipéptido maduro (en general en el N- o C-terminal), la incorporación durante una síntesis peptídica en fase sólida, o a través de medios recombinantes. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a fluorescencia, biotilación e isótopos radiactivos. Las moléculas de polipéptidos y de ácidos nucleicos pueden marcarse mediante métodos *in vitro* e *in vivo*. Pueden obtenerse reactivos y kit de marcaje en una serie de fuentes comerciales (por ejemplo, Thermo Fischer Scientific, Rockford, Ill.; y Molecular Probes/Life Technologies, Grand Island, N.Y.).

Tal como se emplean en la presente, las expresiones “marcador-FLAG”, “octapéptido FLAG” y similares se refieren a un marcador peptídico de ocho aminoácidos (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:2) (marcador) que puede añadirse a un polipéptido usando técnicas de ADN recombinante. Pueden usarse anticuerpos contra el componente FLAG del polipéptido, por ejemplo, para una cromatografía de afinidad y para estudios de localización celular mediante inmunofluorescencia o detección mediante electroforesis de proteínas de SDS-PAGE. Un marcador-FLAG puede usarse junto con otros marcadores de afinidad (por ejemplo, un marcador de polihistidina (marcador-His) o marcador-myc), y puede condensarse al C-terminal o al N-terminal de un polipéptido.

El término “muteínas”, tal como se emplea en la presente, se refiere, en sentido amplio, a proteínas recombinantes mutadas, es decir, un polipéptido que comprende un cambio en la secuencia de aminoácidos introducido artificialmente, por ejemplo, un cambio en la secuencia de aminoácidos generado en el laboratorio o en otras instalaciones por medio de la intervención humana (“la mano humana”). Estas proteínas habitualmente portan sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples, y con frecuencia se originan de genes clonados que se han sometido a una mutagénesis dirigida a sitio o aleatoria, o de genes completamente sintéticos.

Tal como se emplean en la presente con referencia al FGF19 humano nativo o una muteína de FGF19, los términos “modificado”, “modificación” y similares se refieren a uno o más cambios que potencian una propiedad deseada del FGF19 humano, un variante de FGF19 natural, o una muteína de FGF19, en los que el cambio o cambios no alteran la secuencia de aminoácidos primaria del FGF19. Estas propiedades deseadas incluyen, por ejemplo, potenciar la solubilidad, prolongar la semivida en circulación, aumentar la estabilidad, reducir la eliminación, alterar la inmunogenicidad o la alergenicidad, mejorar aspectos de la fabricación (por ejemplo, costes y eficacia), y permitir la generación de anticuerpos concreto (por ejemplo, mediante la introducción de epitopos exclusivos) para su uso en ensayos de detección. Los cambios en el FGF19 humano, en un variante de FGF19 natural, o en una muteína de FGF19 que pueden llevarse a cabo incluyen, pero no se limitan a pegilación (unión covalente de una o más moléculas de polietilenglicol (PEG), o sus derivados); glicosilación (por ejemplo, N-glicosilación), polisialilación y hesilación; fusión de albúmina; unión de albúmina, por ejemplo, a través de una cadena de ácido graso conjugada (acilación); fusión de Fc; y fusión con un mimético de PEG. Algunas realizaciones concretas incluyen modificaciones que implican al polietilenglicol, otras realizaciones concretas incluyen modificaciones que implican a la albúmina, y otras modificaciones concretas incluyen modificaciones que implican una glicosilación.

Los términos y las expresiones “ADN”, “ácido nucleico”, “molécula de ácido nucleico”, “polinucleótido” y similares se emplean de modo intercambiable en la presente para indicar una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos, o sus análogos. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos lineales y circulares, ARN mensajero (ARNm), ADN complementario (ADNc), polinucleótidos recombinantes, vectores, sondas, cebadores y similares.

El término “sonda” se refiere a un fragmento de ADN o ARN que se corresponde con un gen o secuencia de interés, en el que el fragmento se ha marcado de modo radiactivo (por ejemplo, incorporando ³²P o ³⁵S) o con cualquier otra molécula detectable, tal como biotina, digoxígeno o fluoresceína. Puesto que los tramos de ADN o ARN con secuencias complementarias se hibridan, puede usarse una sonda, por ejemplo, para marcar placas víricas, colonias bacterianas o bandas en un gel que contienen el gen de interés. Una sonda puede ser ADN clonado o puede ser una hebra de ADN sintética; esta última puede usarse para obtener un ADNc o clon genómica a partir de una proteína aislada, por ejemplo, mediante microsecuenciación de una porción de la proteína, deducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína, síntesis de un oligonucleótido que porta esa secuencia, marcaje radiactivo de la secuencia y utilización de la secuencia como sonda para seleccionar un banco de ADNc o un banco genómico.

El término “heterólogo” se refiere a dos componentes que se definen mediante estructuras derivadas de diferentes fuentes. Por ejemplo, en el contexto de un polipéptido, un polipéptido “heterólogo” puede incluir secuencias de aminoácidos unidas operablemente que se derivan de diferentes polipéptidos. De manera similar, en el contexto de un polinucleótido que codifica un polipéptido químico, un polinucleótido “heterólogo” puede incluir secuencias de ácidos nucleicos unidas operablemente que pueden derivarse de diferentes genes. Los ejemplos de ácidos nucleicos “heterólogos” incluyen construcciones de expresión en las que un ácido nucleico que comprende una secuencia codificadora se une operablemente a un elemento regulador (por ejemplo, un promotor) que tiene un origen genético diferente de el de la secuencia codificadora (por ejemplo, para proporcionar la expresión en una célula hospedante de interés, que puede tener un origen genético diferente de el del promotor, la secuencia codificadora o ambos). En el contexto de las células recombinantes, “heterólogo” puede referirse a la presencia de un ácido nucleico (o producto génico, tal como un polipéptido) que tiene un origen genético diferente de el de la célula hospedante en la cual está presente.

La expresión “unido operablemente” se refiere a un enlace entre moléculas para proporcionar una función deseada. Por ejemplo, “unido operablemente” en el contexto de los ácidos nucleicos se refiere a un enlace funcional entre secuencias de ácidos nucleicos. Como ejemplo, una secuencia de control de la expresión de un ácido nucleico (tal como un promotor, una secuencia señal o un conjunto de sitios de unión de factores de transcripción) puede unirse operablemente a un segundo polinucleótido, en el que la secuencia de control de la expresión afecta a la transcripción y/o la traducción del segundo polinucleótido. En el contexto de un polipéptido, “unido operablemente” se refiere a un enlace funcional entre secuencias de aminoácidos (por ejemplo, diferentes dominios) para

proporcionar una actividad descrita del polipéptido.

Tal como se emplea en la presente en el contexto de la estructura de un polipéptido, “extremo N-terminal” (o “amino terminal”) y “extremo C-terminal” (o “carboxilo terminal”) se refieren a los extremos finales amino y carboxilo del polipéptido, respectivamente, mientras que los términos “N-terminal” y “C-terminal” se refieren a posiciones relativas en la secuencia de aminoácidos del polipéptido hacia el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, respectivamente, y pueden incluir los restos del extremo N-terminal y C-terminal, respectivamente. “Inmediatamente N-terminal” o “inmediatamente C-terminal” se refieren a una posición de un primer resto aminoácido con relación a un segundo resto aminoácido, en los que el primer y segundo resto aminoácido están unidos covalentemente para proporcionar una secuencia de aminoácidos contigua.

“Derivado de”, en el contexto de una secuencia de aminoácidos o una secuencia polinucleotídica (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos “derivada de” un polipéptido de FGF19), indica que el polipéptido o el ácido nucleico tiene una secuencia que se basa en la de un polipéptido o ácido nucleico de referencia (por ejemplo, un polipéptido de FGF19 natural o un ácido nucleico que codifica FGF19), y no pretende limitarse a la fuente o el método por los cuales se preparan la proteína o el ácido nucleico. Como ejemplo, la expresión “derivado de” incluye homólogos o variantes de las secuencias de aminoácidos o de ADN de referencia.

En el contexto de un polipéptido, el término “aislado” se refiere a un polipéptido de interés que, si es natural, se encuentra en un entorno diferente al que aparece en la naturaleza. “Aislado” incluye polipéptidos que están incluidos en muestras que están sustancialmente enriquecidas en el polipéptido de interés y/o en las que el polipéptido de interés está parcial o sustancialmente purificado. Si el polipéptido no es natural, “aislado” indica que el polipéptido se ha separado del entorno en que ha sido preparado por medios sintéticos o recombinantes.

“Enriquecido” significa que una muestra se manipula por medios no naturales (por ejemplo, por un científico o un médico), de modo que el polipéptido de interés está presente a) en una concentración mayor (por ejemplo, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 8 mayor, al menos 64 mayor o más) que la concentración del polipéptido en la muestra inicial, tal como una muestra biológica (por ejemplo, una muestra en la que el polipéptido está presente de modo natural o en la que está presente después de la administración), o b) en una concentración mayor que en el entorno en el cual se preparó el polipéptido (por ejemplo, como en una célula bacteriana).

“Sustancialmente puro” indica que un componente (por ejemplo, un polipéptido) constituye más de aproximadamente 50% del contenido total de la composición, y generalmente más de aproximadamente 60% del contenido total de polipéptidos. Más generalmente, “sustancialmente puro” se refiere a composiciones en las que al menos 75%, al menos 85%, al menos 90% o más de la composición total es el componente de interés. En algunos casos, el polipéptido constituirá más de aproximadamente 90%, o más de aproximadamente 95% del contenido total de la composición.

Los términos “ensayar” y “medir”, y sus variaciones gramaticales, se emplean de modo intercambiable en la presente y se refieren a determinaciones cualitativas o cuantitativas, o determinaciones cualitativas y cuantitativas. Cuando los términos se emplean con referencia a una detección, se contempla cualquier medio para evaluar la cantidad relativa, que incluyen los diversos métodos indicados en la presente y conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión génica puede ensayarse o medirse mediante transferencia Northern, transferencia Western, un ensayo de inmunoprecipitación, o midiendo la actividad, la función o la cantidad de la proteína expresada.

Los términos “anticuerpos” (Ab) e “inmunoglobulinas” (Ig) se refieren a glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos muestran especificidad de unión con un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen anticuerpos y otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno.

La expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades muy pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio de unión antigénico. Por contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que pueden incluir diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante sobre el antígeno.

En el contexto de un anticuerpo, el término “aislado” se refiere a un anticuerpo que se ha separado y/o recuperado a partir de componentes contaminantes de su entorno natural; estos componentes contaminantes incluyen materiales que pueden interferir con los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “dependiente de FGF19” y expresiones similares, usadas en el contexto de una enfermedad, una afección o un trastorno, tal como un tumor o cáncer, se refieren a una enfermedad, una afección o un trastorno que está provocado, en su totalidad o en parte, por la expresión de FGF19. En ciertos casos, la expresión de FGF19 está amplificada cuando se compara con un control. En algunos casos, la

expresión de FGF19 se amplifica en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más, o cualquier intervalo numérico entre estos. En algunos casos, la expresión amplificada de FGF19 provoca directamente la enfermedad, la afección o el trastorno, o uno de sus síntomas. En otros casos, la expresión amplificada de FGF19 provoca indirectamente la enfermedad, la afección o el trastorno, o uno de sus síntomas.

Factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19)

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) son una familia de factores de crecimiento que desempeñan papeles clave en la proliferación y la diferenciación celular. Se han identificado 22 miembros de la familia de FGF en seres humanos, y todos son moléculas de señalización relacionadas desde el punto de vista estructural. La subfamilia FGF19 de FGF consiste en FGF21, FGF23 y FGF19 humanos y FGF15 de ratón.

Los efectos fisiológicos de los miembros de la familia de FGF son el resultado de la unión dependiente de heparina a uno o más miembros de la familia de receptores de tirosina quinasa de FGF (FGFR), que incluye cuatro miembros (FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4), en los que cada uno contiene un dominio tirosina quinasa. Además, cada uno de FGFR1, FGFR2 y FGFR3 también presenta dos variantes de corte y empalme, denominados variantes "b" y "c" (concretamente, FGFR1b, FGFR2b, FGFR3b, FGFR1c, FGFR2c y FGFR3c).

El FGF19 se dirige a adipocitos y hepatocitos, y produce efectos sobre ellos. Ratones tratados con FGF19 humana recombinante, a pesar de estar consumiendo una dieta rica en grasas, presentan mayores tasas metabólicas, mayor oxidación de lípidos, un cociente respiratorio más bajo, y pérdida de peso. Los efectos metabólicos del FGF19 se producen a través de su unión a los receptores FGFR1c, FGFR2c y FGFR3c, de los cuales la unión a FGFR1c y FGFR2c es la más significativa. La unión de FGF19 a estos receptores requiere del correceptor Klotho-β (KLB).

También se ha demostrado que FGF19 regula la producción de bilis por el hígado. Así, los agentes similares a FGF19 pueden desempeñar un papel importante en la homeostasis del ácido biliar. Los resultados sugieren que el metabolismo del ácido biliar hepático regulado por FGF19 puede ser independiente de su efecto de disminución de la glucosa.

Tal como se mencionó en otro punto en la presente, el uso de la cirugía de derivación gástrica para el tratamiento de la diabetes ha demostrado curar de modo completo y persistente la diabetes de tipo II en la mayoría de los pacientes. Este "efecto bariátrico" es evidente tan solo días después de la cirugía y mucho antes de que se logre una pérdida de peso significativa. Los niveles de FGF19 aumentan después de una cirugía bariátrica, y pueden ser responsables del efecto bariátrico.

El FGF19 se expresa como un polipéptido de 216 aminoácidos que comprende un péptido señal de 22 restos (GenBank: AAQ88669.1). El FGF19 humano maduro (de tipo salvaje) es un polipéptido de 194 aminoácidos que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRY
LCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP
EDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO:3).

FGF19 y el carcinoma hepatocelular

Tal como se describe en la presente, el FGF19 está asociado con la inducción del cáncer, en particular HCC, el tipo más habitual de cáncer de hígado. En la presente se describen métodos y modelos para identificar un polipéptido, o una de sus subsecuencias, variantes o formas modificadas, tal como se indica en la presente, que tiene una actividad metabólica deseada (por ejemplo, una actividad de disminución de la glucosa), pero que carece de actividad HCC o no tiene una actividad HCC sustancial. En otro punto en la presente se describen diversos trastornos metabólicos y ciertos métodos asociados (por ejemplo, métodos para medir los niveles de glucosa), junto con métodos para detectar cánceres, y estos son conocidos en la técnica.

Pueden usarse diversas metodologías para la búsqueda y el diagnóstico del HCC y estas son muy conocidas por los expertos en la técnica. Los indicadores del HCC incluyen, pero no se limitan a la detección de un marcador tumoral, tal como niveles elevados de alfa-fetoproteína (AFP) o des-gamma carboxiprotrombina (DCP). También están disponible una serie de diferentes técnicas de barrido y formación de imágenes, que incluyen ultrasonidos, barridos de CT y MRI. Con relación a ciertas aplicaciones de los métodos y los modelos proporcionados en la presente, la evaluación de si un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido candidato) muestra evidencias de inducir HCC se determina *in vivo*, por ejemplo, mediante la cuantificación de la formación de nódulos de HCC en un modelo animal (por ejemplo, un modelo de ratón *db/db*) al que se le ha administrado un polipéptido, comparado con la formación de nódulos de HCC inducida por FGF19 de tipo salvaje. A nivel macroscópico, el HCC puede ser nodular, en el que los nódulos del tumor (que con frecuencia son de redondos a ovals, grises o verdes, bien circunscritos pero no encapsulados) aparecen como una gran masa o como múltiples masas más pequeñas. Como alternativa, el HCC puede estar presente como un tumor infiltrante que es difuso y está poco circunscrito y, con frecuencia, se infiltra en las venas portas. Los factores de riesgo para el HCC incluyen la diabetes de tipo 2 (a menudo exacerbada por la obesidad). El riesgo de HCC en diabéticos de tipo 2 es mayor (de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 7 veces

mayor que el riesgo de no diabéticos), dependiendo de la duración de la diabetes y del protocolo de tratamiento.

La evaluación patológica de muestras de tejido hepático en general se realiza después de que los resultados de una o más de las metodologías mencionadas anteriormente indiquen la presencia probable de HCC. Así, ciertas aplicaciones de los métodos proporcionados en la presente incluyen también evaluar una muestra de tejido hepático procedente de un modelo animal *in vivo* útil en estudios de HCC con el fin de determinar si una secuencia polipeptídica muestra evidencias de inducir un HCC. En ciertos casos, el modelo animal *in vivo* es un modelo de ratón *db/db*. Mediante una evaluación microscópica, un patólogo puede determinar si está presente uno de los cuatro tipos citológicos y arquitectónicos generales (patrones) de HCC (concretamente, fibrolaminar, pseudoglandular (adenoide), pleomórfico (células gigantes) y células transparentes).

5
10 *Métodos y modelos para identificar polipéptidos de variantes de FGF19 que presentan características deseadas*

Se describen polipéptidos de variantes de FGF19 y otros agentes que imitan, al menos en algunos aspectos, la actividad de FGF19 en la bibliografía científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Wu *et al.*, PLoS One, 6:e17868 (11 de marzo, 2001); la patente de EE. UU. n.º 8.324.160; y las publicaciones de EE. UU. n.ºs 2011/0195895; 2011/0207912 y 2011/0104152. Aunque no pretenden ser limitantes de ninguna forma, las secuencias de variantes de FGF19 candidatas incluyen polipéptidos que contienen un motivo de secuencia WGDPI (SEQ ID NO:4) que se corresponde con la secuencia WGDPI de los aminoácidos 16-20 de FGF19 (SEQ ID NO:3). Un polipéptido concreto contemplado en la presente tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

15
20 MRDSSPLVHYGWGDPRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSA HSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP EDL
RGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M70, SEQ ID NO:1).

En otros casos, un variante de FGF19 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos indicada como:

RHIPDSSPLLQFGGQVRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M5, SEQ ID NO:5);

25 RDSSPLLQFGGQVRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLCMGAD
GKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHL
ESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M6, SEQ ID NO:6);

30 RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLC
MGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPED
LRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M7, SEQ ID NO:7);

RHIPDSSPHVHYGGQVRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M14, SEQ ID NO:8);

35 RPLAFSDAGPHVHYGGQVRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLC
MGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPED
LRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M15, SEQ ID NO:9);

RHIPDSSPLLQFGDQVRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M32, SEQ ID NO:10);

40 RHIPDSSPLLQFGGNVRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M36, SEQ ID NO:11);

45 RPLAFSDAGPHVHYGGDIRLRLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLC
MGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPED
LRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M43, SEQ ID NO:12);

RHIPDSSPLLQFGDQVRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII EDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR
GHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M50, SEQ ID NO:13);

50 RDSSPLLQWGDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFRLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVARTVAIKGVHVSRYLCMGADG
KMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHL
SDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M52, SEQ ID NO:14);

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADG
KMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLE
SDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M53, SEQ ID NO:15);

5 RPLAFSDAGPHVWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M67, SEQ ID NO:16);

RPLAFSDAGPHVHYWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYL
CMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPE
DLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M68, SEQ ID NO:17);

10 RDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGA
DGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRG
HLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M69, SEQ ID NO:18);

15 MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M70, SEQ ID NO:19);

RVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKM
QGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M75, SEQ ID NO:20);

20 RGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQY
SEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPL
ETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M76, SEQ ID NO:21);

RRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEE
DCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETD
SMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M77, SEQ ID NO:22);

25 RPLAFSDAAPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRY
LCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP
EDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M83, SEQ ID NO:23);

30 RPLAFSDAGAHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRY
LCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP
EDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M84, SEQ ID NO:24);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRY
LCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIREDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP
EDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M140, SEQ ID NO:25);

35 HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMG
ADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR
GHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M144 (M5-R), SEQ ID NO:26);

DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADG
KMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLE
SDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M145 (M6-R), SEQ ID NO:27);

40 HPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMG
ADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIILEDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRG
HLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M146 (M50-R), SEQ ID NO:28);

45 RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRQRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRY
LCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIILEDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPE
DLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M160, SEQ ID NO:29);

o una subsecuencia o fragmento de cualquiera de las anteriores secuencias de péptidos. El resto N-terminal puede
delecionarse en cualquiera de las anteriores secuencias de péptidos.

50 Tal como se describió previamente, la presente descripción contempla un método para determinar si un sujeto de
estudio que padece un trastorno metabólico es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19,
comprendiendo dicho método: (a) proporcionar un sujeto de estudio que presenta un indicio de un trastorno
canceroso, y el sujeto padece un trastorno metabólico, (b) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un
variante de FGF19 al sujeto de estudio, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al
sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y (c) determinar

si un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio se incrementa; en el que la ausencia de incremento de un indicio de un trastorno canceroso indica que el sujeto de estudio es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19.

5 La presente descripción también contempla un método para determinar si un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar un sujeto de estudio que presenta un indicio de un trastorno canceroso, y el sujeto de estudio padece un trastorno metabólico, (b) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un variante de FGF19 al sujeto de estudio, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y (c) determinar si un indicio de un trastorno
10 canceroso en el sujeto de estudio se reduce; en el que la reducción de un indicio de un trastorno canceroso indica que el sujeto de estudio es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19.

15 La presente descripción también contempla un método para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para tratar un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho método: (a) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y el variante de FGF19 al sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y (b) determinar si se observa un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio; en el que la ausencia de un indicio de un trastorno canceroso indica que el variante de FGF19 es un candidato para el tratamiento del sujeto de estudio.

20 Otra aplicación contemplada en la presente se dirige a un método para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para tratar un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, y dicho sujeto presenta un indicio de un trastorno canceroso, (b) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un variante de FGF19 al sujeto de estudio, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para exacerbar un trastorno canceroso en una población de referencia, y (c) determinar si un indicio de un trastorno
25 canceroso en el sujeto de estudio se incrementa; en el que la ausencia de exacerbación de un indicio de un trastorno canceroso indica que el variante de FGF19 es un candidato para el tratamiento del sujeto de estudio. En casos concretos, uno o más indicios de un trastorno canceroso se reducen en el sujeto de estudio.

30 En ciertas aplicaciones de los métodos proporcionados en la presente, el variante de FGF19 se selecciona del grupo que consiste en M5, M6, M7, M14, M15, M32, M36, M43, M52, M53, M67, M68, M69, M70, M75, M76, M77, M83, M84, M140, M144, M145, M146 y M160. En algunos casos, también se contempla cualquier combinación de dos o más de los anteriores variantes de FGF19.

35 En algunas aplicaciones de los métodos proporcionados en la presente, el variante de FGF19 comprende una secuencia de aminoácidos indicada en una cualquiera de SEQ ID NO:5-29; o una de sus subsecuencias o fragmentos. En ciertos casos, el resto R N-terminal está deletado. En algunos casos, el variante de FGF19 comprende una subsecuencia de cualquiera de las anteriores secuencias. En otros casos, también se contempla cualquier combinación de dos o más de los anteriores variantes de FGF19.

40 En algunas aplicaciones de los métodos proporcionados en la presente, el variante de FGF19 consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en una cualquiera de SEQ ID NO:5-29; o una de sus subsecuencias o fragmentos. En ciertos casos, el resto R N-terminal está deletado. En algunos casos, el variante de FGF19 consiste en una subsecuencia de cualquiera de las anteriores secuencias. En otros casos, también se contempla cualquier combinación de dos o más de los anteriores variantes de FGF19.

45 Tal como se mencionó anteriormente, la presente descripción también contempla diversos modelos. Puede usarse cualquier modelo que proporcione resultados fiables y reproducibles. Los expertos en la técnica están familiarizados con modelos que pueden usarse junto con el contenido de la presente descripción. En algunos casos se emplean modelos de roedor, en particular modelos de ratón. Además de los modelos de ratón *ob/ob* usados en los ejemplos de la sección experimental, pueden emplearse los modelos de *db/db*, *db/ob* y DIO en la práctica de aspectos de la presente descripción.

50 Uno de estos modelos es para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para prevenir una enfermedad, una afección o un trastorno canceroso en un sujeto que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho modelo un sujeto que (i) no muestra un indicio de un trastorno canceroso antes de la administración de una cantidad eficaz de FGF19 o un sustituto de FGF19, y (ii) muestra un indicio de un trastorno canceroso después de la administración de FGF19 o un sustituto de FGF19; y en el que un indicio de un trastorno canceroso mejora tras la administración de una cantidad eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1. En ciertos casos, el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.

55 La presente descripción también contempla un modelo para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para tratar una enfermedad, una afección o un trastorno canceroso en un sujeto que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho modelo un sujeto que presenta al menos un indicio de cáncer que surge de la administración de FGF19 o un sustituto de FGF19, en el que el indicio de cáncer mejora tras la administración de

una cantidad eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1. En ciertos casos, el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.

En la presente se describe un modelo para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para prevenir una enfermedad, una afección o un trastorno canceroso en un sujeto que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho modelo un sujeto que i) no muestra un indicio de un trastorno canceroso antes de la administración de una cantidad eficaz de FGF19 o un sustituto de FGF19, y ii) muestra un indicio de un trastorno canceroso después de la administración de FGF19 o un sustituto de FGF19; y en el que un indicio de un trastorno canceroso mejora tras la administración de una cantidad eficaz de un variante de FGF19.

En la presente también se describe un modelo para determinar si un variante de FGF19 es un candidato para tratar una enfermedad, una afección o un trastorno canceroso en un sujeto que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho modelo un sujeto que presenta al menos un indicio de cáncer que surge de la administración de FGF19 o un sustituto de FGF19, en el que el indicio de cáncer mejora tras la administración de una cantidad eficaz de un variante de FGF19.

En ciertas aplicaciones de los modelos proporcionados en la presente, el variante de FGF19 comprende una secuencia de aminoácidos indicada en una cualquiera de SEQ ID NO:5-29; o una de sus subsecuencias o fragmentos. En otros casos, el variante de FGF19 consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en una cualquiera de SEQ ID NO:5-29; o una de sus subsecuencias o fragmentos. En ciertos casos, el resto R N-terminal está delecionado. En ciertos casos, el variante de FGF19 comprende o consiste en una cualquiera de las secuencias anteriores, en las que el resto R N-terminal está delecionado. En algunos casos, el variante de FGF19 comprende o consiste en una subsecuencia de cualquiera de las anteriores secuencias. En otros casos, también se contempla cualquier combinación de dos o más de los anteriores variantes de FGF19.

Evaluación del efecto del FGF19 coadministrado con un variante de FGF19

En los ejemplos indicados en la sección experimental, se evaluó el impacto sobre ratones *db/db* de FGF19 administrado por sí solo o coadministrado con el variante de FGF19 M70. Se empleó un virus adenoasociado ("adeno-associated virus", AAV) para transportar y expresar genes exógenos de interés en ratones y permitir su exposición continua, persistente y sistémica a proteínas codificadas por los transgenes.

La figura 2 muestra las concentraciones de FGF19 en plasma determinadas mediante ELISA en ratones *db/db* cinco semanas después del transporte de genes mediado por AAV de GFP (control); FGF19 (dos dosis distintas); y FGF19 y el variante de FGF19 M70 (dos dosis distintas de cada uno). Las altas concentraciones de FGF19 observadas después de la coadministración de los transgenes de FGF19 y M70 refleja las contribuciones de la expresión del variante de FGF19 M70 y de FGF19. Se empleó FGF19-flag en los ejemplos para facilitar la cuantificación de los resultados experimentales; tal como se indica en la sección experimental, el componente de c-Flag no afectó a los efectos tumorigénicos de FGF19, aunque puede afectar a los efectos antidiabéticos de FGF19.

Se evaluó el impacto potencial de la coadministración de FGF19 y del variante de FGF19 M70 sobre el HCC, comparado con la administración de FGF19 por sí solo. Tal como se muestra en la figura 3, la expresión ectópica de FGF19 en el modelo de ratón *db/db* estimula la formación de múltiples nódulos de tumor grandes y alzados que sobresalen de la superficie del hígado, mientras que los hígados aislados de ratones que expresan ambos FGF19 y M70 están completamente exentos (bajo las condiciones empleadas) de nódulos hepáticos. Además, la tumorigénesis mediada por FGF19, según se pone de manifiesto por medio de la aparición de lesiones hepáticas, es completamente suprimida cuando se coexpresan los transgenes FGF19 y M70. Estos datos son sorprendentes, puesto que sugieren que no solo el variante de FGF19 modificado M70 carece del potencial tumorigénico en ratones asociado con la proteína de tipo salvaje, sino que también puede interferir de modo eficaz con los efectos proliferativos de la proteína de tipo salvaje. Aunque no es necesaria una comprensión precisa del mecanismo de acción subyacente asociado con este fenómeno para la práctica de la presente invención, este puede ser debido, al menos en parte, a la competición de M70 por el FGF19 de tipo salvaje en el sitio de unión de FGF19.

El ejemplo 4 muestra el efecto sobre el peso corporal del ratón medido inicialmente antes de la inyección y determinado posteriormente 3, 5 y 23 semanas después de la inyección de los transgenes indicados. Tal como se muestra en la figura 4, los ratones *db/db* transgénicos que coexpresan el variante de FGF19 M70 y el FGF19 muestran reducciones significativas en el peso corporal comparado con animales dosificados con el control, mientras que se observaron efectos menos dramáticos sobre el peso corporal en ratones que solo expresan el transgén FGF19. Los cambios en el peso corporal observados en ratones que coexpresan los transgenes FGF19 y M70 también se reflejaron en unos pesos reducidos del hígado, comparado con los pesos de hígados recolectados de animales en el grupo control.

De una manera similar a la de la determinación del peso corporal, también se evaluó el efecto de la expresión de los transgenes sobre la glucosa en sangre antes de la inyección de los transgenes y 3, 5 y 23 semanas después de la inyección. Los resultados, indicados en la figura 5, indican que los ratones *db/db* transgénicos que coexpresan el variante de FGF19 M70 y el FGF19 muestran reducciones significativas en las concentraciones de glucosa en sangre, comparado con los animales control.

Como expansión de las fechas y los estudios anteriores, y tal como se proporciona en los ejemplos 6-11 de la sección experimental, se estableció un modelo de tumorigenicidad *in vivo* en ratones para evaluar la hepatocarcinogenicidad inducida por FGF19 para intentar dirigirse a FGF19 en la tumorigénesis sin comprometer sus papeles fundamentales, por ejemplo, en la homeostasis del ácido biliar. El ejemplo 7 muestra un sistema de transgenes mediado por AAV para la evaluación de la tumorigénesis hepatocelular *in vivo*. La expresión del transgén FGF19 se introdujo usando una estrategia de transporte de genes mediado por AAV (Zhang *et al.*, 2009, Hum. Gene Ther., 20, 922-929). Tal como se indica en el ejemplo 8, se evaluó un panel de variantes de FGF19 *in vivo* y se identificaron los variantes que no provocan tumores que incluyen M70. De modo notable, tal como se muestra en los ejemplos 8 y 9, se demostró que M70 conserva la actividad beneficiosa de regular la homeostasis del ácido biliar, y también se demostró que M70 se une y activa a FGFR4, que se supone que media en la tumorigenicidad asociada con FGF19 (French *et al.*, 2012, PLoS one 7, e36713; Wu *et al.*, 2010, J. Biol. Chem., 285, 5165-5170). Tal como se muestra en el ejemplo 10, se demostró mecanísticamente que FGF19 estimula el avance del tumor activando la vía de STAT3, una actividad eliminada en M70. Además, tal como se muestra en el ejemplo 11, se demostró que M70 inhibe el crecimiento tumoral dependiente de FGF19 en modelos de múltiples tumores. Además, tal como se muestra en el ejemplo 12, se demostró que M70 inhibe el crecimiento del tumor de colon en un modelo de ratón singénico.

Así, en los ejemplos proporcionados en la presente, se modifican hormonas naturales para eliminar selectivamente actividades perjudiciales potenciales (concretamente, tumorigenicidad), manteniendo intacta la función beneficiosa (concretamente, metabolismo del ácido biliar). A través de un intenso análisis de actividad y estructura, se identificó el M70 como un variante FGF19 que no provoca tumores, que se une y activa selectivamente el complejo de receptor FGFR4 para mantener la homeostasis del ácido biliar. Los ratones con una exposición prolongada a niveles suprafisiológicos de M70 (24 semanas en ratones *db/db*, 52 semanas en ratones *rasH2*) estaban exentos de tumores hepáticos (ejemplo 8; figuras 7 y 8). También se demostró que M70 bloquea la tumorigenicidad asociada a FGF19 en ratones y en xenoinjertos de cáncer humano (ejemplo 11, figura 11). Aunque previamente se habían identificado variantes de FGF19 que no provocan tumores (Wu *et al.*, 2011, PLoS one 6, e17868; Wu *et al.*, 2010a, PNAS, 107, 14158-14163), estos variantes fueron diseñados específicamente para eliminar la unión a FGFR4 y, por extensión, estaban alterados en su regulación del metabolismo del ácido biliar. Por contraste, M70 muestra una potencia y eficacia similares en la unión a FGFR4, y regula las vías de Cyp7a1 y pERK corriente abajo de FGFR4 (ejemplos 9 y 10; figuras 9 y 10). Estos resultados proporcionan pruebas *in vivo* de activación selectiva del complejo de receptor FGFR4/KLB, que no conducen a la tumorigénesis hepatocelular.

Las principales diferencias entre M70 y FGF19 se encuentran en el extremo N-terminal de la proteína. Cada proteína de la familia de FGF consiste en el dominio globular central estructuralmente conservado, y los segmentos flanqueantes N-terminal y C-terminal que son estructuralmente flexibles y tienen una secuencia primaria distinta (Beenken y Mohammadi, 2009, Nat. Rev. Drug Discov., 8, 235-253). En las estructuras cristalinas de rayos X de múltiples complejos de FGF/FGFR, el segmento N-terminal de la molécula de FGF establece un contacto específico con el FGFR y se cree que desempeña un papel importante en la determinación de la especificidad de la interacción entre FGF-FGFR (Beenken y Mohammadi, 2009, Nat. Rev. Drug. Discov., 8, 235-253). En el transcurso de la selección sistemática *in vivo* de los inventores, se demostró que el cambio de 3 aminoácidos en el extremo N-terminal, acoplado con una delección de 5 aa elimina la tumorigenicidad sin alterar su capacidad para activar procesos dependientes de FGFR4, tales como la regulación del ácido biliar.

Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, varias líneas de pruebas indican que M70 muestra las características farmacológicas de un "ligando sesgado" o un modulador selectivo. Por ejemplo, tal como se muestra en el ejemplo 9 y la figura 9, M70 se une al dominio extracelular de FGFR4 con una potencia y eficacia similares al FGF19 de tipo salvaje. El M70 activa la fosforilación de ERK en células transfectadas con FGFR4-KLB o FGFR4 o células que expresan FGFR4-KLB de forma endógena. Al igual que FGF19, M70 potencialmente reprime Cyp7a1 en hepatocitos primarios y en ratones. A diferencia de FGF19, M70 no estimula la formación de tumores hepáticos. De nuevo, aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, la falta de tumorigenicidad de M70 puede explicarse por su falta de activación de pSTAT3, una molécula de señalización clave en las vías carcinogénicas hepatocelulares.

Tal como se muestra en el ejemplo 10 y la figura 10, se demostró que FGF19, pero no M70, activa la STAT3 en el hígado. La STAT3 es un actor principal en la oncogénesis hepatocelular (He y Karin, 2011, Cell Res., 21, 159-168). La STAT3 fosforilada (es decir, activada) se encuentra en aproximadamente 60% de los HCC en seres humanos (He *et al.*, 2010, Cancer Cell, 17, 286-297). La activación de STAT3 también se correlaciona con una mala prognosis en pacientes con HCC (Calvisi *et al.*, 2006, Gastroenterol. 130, 1117-1128). La STAT3 constitutivamente activa actúa sobre un oncogén en la transformación celular (Bromberg *et al.*, 1999, Cell, 98, 295-303). La ablación de STAT3 específica de hepatocitos evita el desarrollo de HCC en ratones (He *et al.*, 2010, Cancer Cell, 17, 286-297). Los inhibidores de la activación de STAT3 bloquean el crecimiento de células de cáncer humanas y se están ensayando en la clínica para tratar diversos cánceres, que incluyen HCC (Chen *et al.*, 2010, Clin. Cancer Res., 16, 5189-5199; Karras *et al.*, 2000, Cellular Immunol., 202, 124-135; Lin *et al.*, 2009, Oncogene, 28, 961-972). Se postula que la IL-6, entre otras citoquinas inflamatorias, es el principal activador de STAT3 en el hígado (He *et al.*, 2010, (He *et al.*, 2010, Cancer Cell, 17, 286-297). Se ha demostrado que la señalización de IL-6 estimula el avance maligno de progenitores del cáncer hepático (He *et al.*, 2013, Cell, 155, 384-396). Se ha observado una mayor producción de IL-

6 en pacientes con cirrosis biliar primaria, un trastorno colestático asociado con un mayor riesgo de HCC (Kakumu *et al.*, 1993, *Gastroenterologia Japonica*, 28, 18-24). En el ejemplo 10 y la figura 10 también se demuestra que FGF19 activa la señalización de STAT3 *in vivo*. Este efecto puede estar directamente mediado por el complejo de receptor FGFR4, o de modo indirecto a través de la inducción de citoquinas o factores de crecimiento. En efecto, la expresión de IL-6 es mayor en los hígados de los animales tratados con of FGF19 en los estudios de los inventores (ejemplo 10; figura 10).

El M70 puede unirse a un sitio ortostérico sobre FGFR4, puesto que M70 es capaz de desplazar o interferir con la unión de FGF19 e inhibe la tumorigenicidad asociada con FGF19, aunque M70 no bloquea todas las vías de modo no discriminativo en el mismo grado. El M70 muestra un sesgo hacia ciertas vías de señalización de FGFR4 (concretamente, Cyp7a1, pERK) con la relativa exclusión de otras (concretamente, tumor), al igual que se observa para ciertos moduladores alostéricos (figura 12).

Desde un punto de vista terapéutico, los estudios de los inventores también proporcionan apoyo experimental para el uso de M70 en enfermedades hepáticas crónicas y cánceres. El M70 puede ser útil como agente anticáncer para el tratamiento de tumores dependientes de FGF19 (véanse, por ejemplo, los ejemplos 8 y 11; figuras 7, 8 y 11). Esto es particularmente cierto, puesto que el FGF19 está amplificado en aproximadamente 15% de HCC humanos, y se encuentra sobrerregulado en la cirrosis y los trastornos colestáticos que a menudo conducen al desarrollo de un tumor. Aunque un informe anterior ha indicado el desarrollo de un anticuerpo monoclonal anti-FGF19 neutralizante que muestra actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto (Desnoyers *et al.*, 2008, *Oncogene*, 27, 85-97), esta estrategia provocó efectos adversos graves. La administración de este anticuerpo a monos cynomolgus condujo a una toxicidad hepática relacionada con la dosis, acompañada de diarrea grave, debido a la inhibición en la diana del FGF19 endógeno, que provoca un aumento en la síntesis de ácido biliar hepático, un aumento en el ácido biliar en suero, una perturbación de la circulación enterohepática, y el desarrollo de diarrea y toxicidad hepática (Pai *et al.*, 2012, *Toxicological Sciences*, 126, 446-456).

Tal como se muestra en la sección experimental, y en contraste con los anticuerpos neutralizantes, los estudios de los inventores demuestran que M70 conserva la actividad de FGF19 en la regulación del ácido biliar, al mismo tiempo que elimina la tumorigenicidad (véanse, por ejemplo, los ejemplos 8, 9 y 11; figuras 8, 9 y 11). Esto asegura la conservación de la homeostasis del ácido biliar cuando se emplea como agente anticáncer. De manera importante, los datos experimentales proporcionados en la presente demuestran que M70 no solo carece de potencial tumorigénico, sino que también puede interferir con eficacia en los efectos tumorigénicos asociados con FGF19 de tipo salvaje. Además, M70 inhibe el crecimiento de tumores de xenoinjertos de cáncer de colon, además del HCC mediado por FGF19. El M70 también inhibe el crecimiento del cáncer de colon en un modelo de ratón singénico (véase, por ejemplo, el ejemplo 12 y la figura 13). Estos resultados confirman que, como modulador de FGFR4 selectivo, el M70 antagoniza la actividad oncogénica de FGF19.

Tal como se muestra en la sección experimental, también se estableció un sistema de alta capacidad de tratamiento robusto para evaluar múltiples proteínas en la tumorigénesis hepatocelular en ratones adultos usando el transporte de genes mediado por AAV. Se demostró que la sobreexpresión de FGF19 en un sitio ortotópico (hígado) condujo a displasia hepática y al desarrollo de HCC en múltiples razas de ratones. Esto elimina los factores de confusión en la embriogénesis y el desarrollo en la estrategia de ratones transgénicos tradicional. No son necesarios promotores de tumores químicos, tales como dietilnitrosamina (DEN) o fenobarbital, para el inicio o la estimulación de tumores. La misma estrategia puede adaptarse para evaluar otros oncogenes, proteínas de señalización, así como variantes de proteínas naturales.

El FGF19 muestra un conjunto de efectos biológicos. El potencial terapéutico de FGF19 incluye el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas, así como la obesidad y la diabetes, pero la estimulación de la proliferación de hepatocitos y el potencial carcinogénico que provoca son un problema para el desarrollo de FGF19 para un uso crónico. Sin embargo, con la identificación de M70 como variante de FGF19 modificado que no provoca tumorigenicidad, aunque conserva sus potentes propiedades metabólicas, se pueden lograr beneficios terapéuticos sin efectos secundarios no deseados. Los resultados de los inventores no solo confirman que la activación selectiva del complejo de receptor FGFR4-KLB no induce la formación de tumores hepáticos, sino que además proporciona nuevos caminos para utilizar esta vía para tratar el cáncer, las enfermedades con desregulación del ácido biliar, la diabetes de tipo 2 y otros trastornos metabólicos.

Polipéptidos y moléculas de ácidos nucleicos

La presente descripción también contempla fragmentos activos (por ejemplo, subsecuencias) de los polipéptidos que contienen restos aminoácidos contiguos derivados de las secuencias de polipéptidos descritas en la presente. La longitud de los restos aminoácidos contiguos de un péptido o una subsecuencia de un polipéptido varía dependiendo de la secuencia de aminoácidos natural específica de la cual se deriva la subsecuencia. En ciertos casos, los péptidos y polipéptidos tienen de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 15 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos, de aproximadamente 25 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos, de aproximadamente 30 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos, de aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, de

aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 75 aminoácidos, de aproximadamente 75 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, o de aproximadamente 100 aminoácido hasta el polipéptido de longitud completa.

5 En ciertas realizaciones de los polipéptidos de variantes de FGF19 proporcionados en la presente, el número total de restos aminoácidos (o sus miméticos) es menor que aproximadamente 250. En otras realizaciones, el número de restos aminoácidos varía de aproximadamente 190 a aproximadamente 230, de aproximadamente 200 a aproximadamente 225, o de aproximadamente 210 a aproximadamente 220 restos. En otras realizaciones, el número de restos aminoácidos es mayor que 190, mayor que 195, mayor que 200, mayor que 205, mayor que 210, mayor que 215, mayor que 220 o mayor que 225 restos.

10 Además, en ciertas realizaciones, los polipéptidos tienen una identidad de secuencia definida comparada con una secuencia de referencia a través de una longitud definida de aminoácidos contiguos (por ejemplo, una “ventana de comparación”). Los métodos para alinear secuencias para la comparación son muy conocidos en la técnica. Puede realizarse un alineamiento óptimo de secuencias para la comparación, por ejemplo, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981), por medio del algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), por medio del método de la búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988), por medio de aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis.), o por medio de alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., 1995, suplemento)).

20 Como ejemplo, en algunas realizaciones, un polipéptido adecuado comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con un tramo contiguo de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 12 aminoácidos, de aproximadamente 12 aminoácidos a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 15 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos, de aproximadamente 25 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos, de aproximadamente 30 aminoácidos a aproximadamente 35 aminoácidos, de aproximadamente 35 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos, de aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 45 aminoácidos, de aproximadamente 45 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, de aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 60 aminoácidos, de aproximadamente 60 aminoácidos a aproximadamente 70 aminoácidos, de aproximadamente 70 aminoácidos a aproximadamente 80 aminoácidos, de aproximadamente 80 aminoácidos a aproximadamente 90 aminoácidos, de aproximadamente 90 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, de aproximadamente 100 aminoácidos a aproximadamente 110 aminoácidos, de aproximadamente 110 aminoácidos a aproximadamente 120 aminoácidos, de aproximadamente 120 aminoácidos a aproximadamente 130 aminoácidos, de aproximadamente 130 aminoácidos a aproximadamente 140 aminoácidos, de aproximadamente 140 aminoácidos a aproximadamente 150 aminoácidos, de aproximadamente 150 aminoácidos a aproximadamente 160 aminoácidos, de aproximadamente 160 aminoácidos a aproximadamente 170 aminoácidos, de aproximadamente 170 aminoácidos a aproximadamente 180 aminoácidos, de aproximadamente 180 aminoácidos a aproximadamente 190 aminoácidos, o de aproximadamente 194 aminoácidos de una de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos se aíslan de una fuente natural (por ejemplo, un entorno distinto de su entorno natural), y también pueden fabricarse de modo recombinante (por ejemplo, en una célula hospedante genéticamente modificada, tal como una bacteria, levadura, *Pichia*, células de insecto y similares), en la que la célula hospedante genéticamente modificada se modifica con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Los polipéptidos también pueden producirse de modo sintético (por ejemplo, mediante una síntesis química sin células). Los métodos de producción se describen con más detalle a continuación.

En algunas realizaciones se genera un polipéptido usando técnicas recombinantes para manipular diferentes ácidos nucleicos relacionados con FGF19 conocidos en la técnica por proporcionar construcciones capaces de codificar el polipéptido. Se apreciará que, cuando se proporciona una secuencia de aminoácidos concreta, los expertos en la técnica reconocerán una diversidad de moléculas de ácidos nucleicos diferentes que codifican dicha secuencia de aminoácidos, según su formación y experiencia, por ejemplo, en biología molecular.

En algunas realizaciones, la presente descripción también proporciona polipéptidos que presentan una o más alteraciones en los restos aminoácidos (por ejemplo, en localizaciones que no se conservan entre variantes o especies), comparado con una secuencia de referencia (por ejemplo, la correspondiente secuencia de tipo salvaje). Estos polipéptidos con frecuencia conservan dominios que están conservados entre especies, y tienen la misma actividad biológica que los polipéptidos naturales. Estos polipéptidos con frecuencia también presentan una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. La expresión “sustitución de aminoácido conservativa” en general se refiere a la sustitución de restos aminoácidos dentro de los siguientes grupos: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; y 6) D, E. Las sustituciones de aminoácidos conservativas conservan la actividad de la proteína reemplazando uno o más aminoácidos en la proteína por un aminoácido con una cadena lateral de acidez, basicidad, carga, polaridad o tamaño similar a los de la cadena lateral. Las indicaciones para las sustituciones,

inserciones o deleciones pueden basarse en alineamientos de secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas variantes o proteínas de especies diferentes.

Se contemplan modificaciones en la región de bucle-8 de FGF19. En la presente, los restos 127-129 (SEQ ID NO:3) de FGF19 se definen como constituyentes de la región de bucle-8, aunque en la bibliografía, la región de bucle-8 a menudo se define para que incluya o consista en otros restos (por ejemplo, restos 125-129). Ciertas combinaciones de sustituciones R127L y P128E en el marco de FGF19 tienen un efecto inesperadamente positivo sobre la formación de HCC. Una combinación de las sustituciones R127L y P128E y una sustitución de Gln (Q) por Leu (L) en la región central de FGF19 también tiene efectos significativos sobre la prevención de la formación de HCC.

Los variantes de la región-8 de FGF19 pueden reducir o eliminar la formación de HCC de una forma sustancial, mensurable o detectable. Además, el efecto de reducir la formación de HCC puede potenciarse mediante modificaciones en restos aminoácidos fuera de la región de bucle-8 (por ejemplo, sustituciones de restos aminoácidos en la región central, tal como la región que se corresponde con los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO:3).

En algunos casos, el variante de bucle-8 modificado es M70: MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVLRRTVAIKGVHSHVRYLCM GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL RGHLESDMFSSPLETDS16MDPFGLVTGLEAV RSPSFEK (SEQ ID NO:70), que comprende una sustitución en la región de bucle-8 de FGF19 (subrayada). En ciertos casos, el variante M70 de bucle-8 modificado comprende una sustitución en la región de bucle-8 de FGF19 (subrayada) que se corresponde con (i) una sustitución R127L, (ii) una sustitución P128E, o (iii) una sustitución R127L y una sustitución P128E. En ciertos casos, el variante M70 de bucle-8 modificado además comprende o comprende además una sustitución en la región central de FGF19. En algunos casos, el variante M70 de bucle-8 modificado comprende una sustitución L18Q.

En otros casos, el variante de bucle-8 modificado es M5 (SEQ ID NO:5), M6 (SEQ ID NO:6), M7 (SEQ ID NO:7), M14 (SEQ ID NO:8), M15 (SEQ ID NO:9), M32 (SEQ ID NO:10), M36 (SEQ ID NO:11), M43 (SEQ ID NO:12), M50 (SEQ ID NO:13), M52 (SEQ ID NO:14), M53 (SEQ ID NO:15), M67 (SEQ ID NO:16), M68 (SEQ ID NO:17), M69 (SEQ ID NO:18), M70 (SEQ ID NO:19), M75 (SEQ ID NO:20), M76 (SEQ ID NO:21), M77 (SEQ ID NO:22), M83 (SEQ ID NO:23), M84 (SEQ ID NO:24), M140 (SEQ ID NO:25), M5-R (SEQ ID NO:26), M6-R (SEQ ID NO:27), M50-R (SEQ ID NO:28), o M160 (SEQ ID NO:29). En algunos casos, el variante de bucle-8 modificado comprende una sustitución en la región de bucle-8 de FGF19 que se corresponde con los aminoácidos 127-129 de SEQ ID NO:3. En ciertos casos, el variante de bucle-8 modificado comprende una sustitución en la región de bucle-8 de FGF19 que se corresponde con (i) una sustitución R127L, (ii) una sustitución P128E, o (iii) una sustitución R127L y una sustitución P128E. En algunos casos, el variante de FGF19 comprende o comprende además una sustitución en la región central que se corresponde con los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO:3. En ciertos casos, el variante de FGF19 comprende o comprende además una sustitución en la región central que se corresponde con una sustitución L22Q.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos descritos en la presente son contempladas por la presente descripción, incluyendo sus isoformas, variantes alélicas y variantes de corte y empalme naturales y no naturales. La presente descripción también incluye secuencias de ácidos nucleicos que varían en una o más bases con respecto a una secuencia de ADN natural, pero que aún se traducen en una secuencia de aminoácidos que se corresponde con un polipéptido, debido a la degeneración del código genético.

40 *Sustituciones del enlace amida*

En algunos casos, un polipéptido incluye uno o más enlaces distintos de los enlaces peptídicos, por ejemplo, al menos dos aminoácidos adyacentes se unen a través de un enlace distinto de un enlace amida. Por ejemplo, para reducir o eliminar la proteólisis no deseada u otros medios de degradación y/ para aumentar la estabilidad en suero y/o para restringir o aumentar la flexibilidad conformacional, pueden sustituirse uno o más enlaces amida dentro del esqueleto de un polipéptido.

En otro ejemplo, uno o más enlaces amida ($-\text{CO}-\text{NH}-$) en un polipéptido pueden reemplazarse por un enlace que es un isómero de un enlace amida, tal como $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2\text{SO}-$. Uno o más enlaces amida en un polipéptido también pueden reemplazarse, por ejemplo, por un enlace pseudopeptídico isómero reducido. Véase Couder *et al.* (1993), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 41:181-184. Estas sustituciones y la forma de llevarlas a cabo son conocidas por los expertos en la técnica.

Sustituciones de aminoácidos

En ciertas realizaciones, se realizan una o más sustituciones de aminoácidos en un polipéptido. A continuación se ofrecen ejemplos no limitantes:

a) una sustitución de aminoácidos hidrófobos sustituidos con alquilo, que incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, norleucina, ácido (S)-2-aminobutírico, (S)-ciclohexilalanina u otros alfa-aminoácidos simples sustituidos con una cadena lateral alifática de C₁-C₁₀ carbonos, que incluye sustituciones de alquilo, alqueno o alquino de cadena

modificados (por ejemplo, hidroximetil bencil éter C-terminal), derivados modificados en el N-terminal, que incluyen amidas sustituidas, tales como alquilamidas e hidrazidas.

En algunos casos, uno o más L-aminoácidos en un polipéptido son reemplazados por un D-aminoácido.

5 En algunos casos, un polipéptido es un análogo retro-inverso (Sela y Zisman (1997), FASEB J., 11:449). Los análogos de péptidos retro-inversos son isómeros de polipéptidos lineales en los que la dirección de la secuencia de aminoácidos está invertida (retro) y la quiralidad, D- o L-, de uno o más aminoácidos en su interior se invierte (inverso), por ejemplo, usando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos. Véase, por ejemplo, Jameson *et al.* (1994), Nature, 368:744; y Brady *et al.* (1994), Nature, 368:692.

10 Un polipéptido puede incluir un dominio de transducción de proteínas ("Protein Transduction Domain", PTD), que se refiere a un polipéptido, polinucleótido, carbohidrato o compuesto orgánico o inorgánico que facilita atravesar una bicapa lipídica, micela, membrana celular, membrana de orgánulo o membrana de vesícula. Un PTD unido a otra molécula facilita que la molécula atraviese una membrana, por ejemplo, para moverse desde el espacio extracelular al espacio intracelular, o desde el citosol al interior de un orgánulo. En algunas realizaciones, un PTD se une covalentemente al extremo amino-terminal de un polipéptido, mientras que en otras realizaciones, un PTD se une covalentemente al extremo carboxilo-terminal de un polipéptido. Los ejemplos de dominios de transducción de proteínas incluyen, pero no se limitan a un dominio de transducción de proteínas de undecapéptido mínimo (que se corresponde con los restos 47-57 de HIV-1 TAT que comprende YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO:30); una secuencia de poliarginina que comprende un número suficiente de argininas para entrar directamente en una célula (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 10-50 argininas); un dominio VP22 (Zender *et al.* (2002), Cancer Gene Ther., 9(6):489-496); un dominio de transducción de proteínas de *Drosophila antennapedia* (Noguchi *et al.* (2003), Diabetes, 52(7):1732-1737); un péptido de calcitonina humana truncado (Trehin *et al.* (2004), Pharm. Research, 21:1248-1256); polilisina (Wender *et al.* (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:13003-13008); RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO:31); transportano GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:32); KALAWAEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (SEQ ID NO:33); y RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:34). Los ejemplos de PTD incluyen, pero no se limitan a YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:30), RKKRRQRRR (SEQ ID NO:35); un homopolímero de arginina de 3 restos arginina a 50 restos arginina. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos de dominios PTD incluyen, pero no se limitan a cualquiera de las siguientes: YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:30); RKKRRQRRR (SEQ ID NO:36); YARAAARQARA (SEQ ID NO:37); THRLPRRRRRR (SEQ ID NO:38); y GGRRARRRRRRR (SEQ ID NO:39).

30 El grupo carboxilo COR_3 del aminoácido en el extremo C-terminal de un polipéptido puede estar presente en forma libre ($R_3 = OH$) o en forma de una sal alcalina o alcalinotérrica fisiológicamente tolerada, tal como, por ejemplo, un sal de sodio, potasio o calcio. El grupo carboxilo también puede estar esterificado con alcoholes primarios, secundarios o terciarios, tales como, por ejemplo, metanol, alcoholes de alquilo C_1-C_6 ramificados o no ramificados, por ejemplo, alcohol etílico o terc-butanol. El grupo carboxilo también puede estar amidado con aminas primarias o secundarias, tales como amoniaco, alquilaminas C_1-C_6 o dialquilaminas C_1-C_6 ramificadas o no ramificadas, por ejemplo, metilamina o dimetilamina.

40 El grupo amino del aminoácido NR_1R_2 en el extremo N-terminal de un polipéptido puede estar presente en forma libre ($R_1 = H$ y $R_2 = H$) o en forma de una sal fisiológicamente tolerada, tal como, por ejemplo, un cloruro o acetato. El grupo amino también puede estar acetilado con ácidos, de modo que $R_1 = H$ y $R_2 =$ acetilo, trifluoroacetilo, o adamantilo. El grupo amino puede estar presente en forma protegida con grupos protectores de amino que se usan de forma convencional en la química de péptidos, tales como, por ejemplo, Fmoc, benciloxicarbonilo (Z), Boc, o Alloc. El grupo amino puede estar N-alquilado en R_1 y/o $R_2 =$ alquilo C_1-C_6 o alqueno C_2-C_8 o aralquilo C_7-C_9 . Los restos alquilo pueden tener una cadena lineal, ramificada o cíclica (por ejemplo, etilo, isopropilo y ciclohexilo, respectivamente).

45 *Métodos de producción de polipéptidos*

Un polipéptido de la presente descripción puede producirse mediante cualquier método adecuado, que incluye métodos recombinantes y no recombinantes (por ejemplo, síntesis química).

A. Síntesis química

50 Cuando un polipéptido se sintetiza de modo químico, la síntesis puede realizarse en fase líquida o en fase sólida. La síntesis peptídica en fase sólida ("solid-phase peptide synthesis", SPPS) permite la incorporación de aminoácidos no naturales y/o la modificación del esqueleto del péptido/proteína. Están disponibles diversas formas de SPPS, tales como Fmoc y Boc, para sintetizar polipéptidos de la presente descripción. Los detalles de la síntesis química son conocidos en la técnica (por ejemplo, Ganesan A., 2006, Mini Rev. Med. Chem., 6:3-10; y Camarero J. A. *et al.*, 2005, Protein Pept Lett., 12:723-728).

55 La síntesis de péptidos en fase sólida puede realizarse como se describe a continuación. Las funciones α (Na) y cualquier cadena lateral reactiva pueden protegerse con grupos lábiles a ácidos o lábiles a bases. Los grupos protectores son estables bajo las condiciones para unir enlaces amida, pero pueden escindirse con facilidad sin

alterar la cadena peptídica que se ha formado. Los grupos protectores adecuados para la función α -amino incluyen, pero no se limitan a los siguientes: t-butiloxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Z), o-clorobenciloxicarbonilo, bifenilisopropiloxicarbonilo, terc-amiloxicarbonilo (Amoc), α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, o-nitrosulfenilo, 2-ciano-t-butoxicarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etilo (Dde) y similares.

Los grupos protectores de cadena lateral adecuados incluyen, pero no se limitan a: acetilo, alilo (All), aliloxicarbonilo (Alloc), bencilo (Bzl), benciloxicarbonilo (Z), t-butiloxicarbonilo (Boc), benciloximetilo (Bom), o-bromobenciloxicarbonilo, t-butilo (tBu), t-butildimetilsililo, 2-clorobencilo, 2-clorobenciloxicarbonilo (2-ClZ), 2,6-diclorobencilo, ciclohexilo, ciclopentilo, 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etilo (Dde), isopropilo, 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencilsulfonilo (Mtr), 2,3,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc), pivalilo, tetrahidropirran-2-ilo, tosilo (Tos), 2,4,6-trimetoxibencilo, trimetilsililo y tritilo (Trt).

En la síntesis en fase sólida, el aminoácido C-terminal se acopla a un material de soporte adecuado. Los materiales de soporte adecuados son aquellos que son inertes para los reactivos y las condiciones de reacción para las reacciones de condensación y escisión discontinuas del proceso de síntesis y que no se disuelven en el medio de reacción que se está usando. Los ejemplos de materiales de soporte disponibles en el mercado incluyen copolímeros de estireno/divinilbenceno que se han modificado con grupos reactivos y/o polietilenglicol; copolímeros de estireno clorometilado/divinilbenceno; copolímeros de estireno hidroximetilado o aminometilado/divinilbenceno, y similares. Puede usarse poliestireno (al 1%-divinilbenceno o TentaGel® derivatizado con alcohol 4-benciloxibencílico (anclaje de Wang) o cloruro de 2-clorotritilo, si se pretende preparar el ácido peptídico. En el caso de la amida del péptido, puede usarse poliestireno (al 1%-divinilbenceno o TentaGel® derivatizado con ácido 5-(4'-aminometil)-3',5'-dimetoxifenoxi)valérico (anclaje de PAL) o un grupo p-(2,4-dimetoxifenilaminometil)fenoxi (anclaje de amida de Rink).

El enlace con el soporte polimérico puede lograrse haciendo reaccionar el aminoácido protegido con Fmoc C-terminal con el material de soporte con la adición de un reactivo de activación en etanol, acetonitrilo, N,N-dimetilformamida (DMF), diclorometano, tetrahydrofurano, N-metilpirrolidona o disolventes similares a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas (por ejemplo, entre 40 °C y 60 °C) y con unos tiempos de reacción, por ejemplo, de 2 a 72 horas.

El acoplamiento del aminoácidos protegido con N α (por ejemplo, el aminoácido Fmoc) al anclaje de PAL, Wang o Rink puede realizarse, por ejemplo, con la ayuda de reactivos de acoplamiento, tales como N,N'-diciohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) u otras carbodiimidias, tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) u otras sales de uronio, o-acil-ureas, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP) u otras sales de fosfonio, N-hidroxisuccinimidias, otras N-hidroxiimidias u oximas en presencia o también en ausencia de 1-hidroxibenzotriazol o 1-hidroxí-7-azabenzotriazol, por ejemplo, con la ayuda de TBTU con la adición de HOBt, con o sin la adición de una base, tal como, por ejemplo, diisopropiletilamina (DIEA), trietilamina o N-metilmorfolina, por ejemplo, diisopropiletilamina con unos tiempos de reacción de 2 a 72 horas (por ejemplo, 3 horas en un exceso en 1,5 a 3 veces del aminoácido y los reactivos de acoplamiento, por ejemplo, en un exceso en 2 veces y a unas temperaturas de entre aproximadamente 10 °C y 50 °C, por ejemplo, 25 °C, en un disolvente, tal como dimetilformamida, N-metilpirrolidona o diclorometano, por ejemplo, dimetilformamida).

En lugar de los reactivos de acoplamiento, también es posible usar los ésteres activos (por ejemplo, pentafluorofenilo, p-nitrofenilo o similares), el anhídrido simétrico del N α -Fmoc-aminoácido, su cloruro de ácido o fluoruro de ácido bajo las condiciones descritas anteriormente.

El aminoácido protegido con N α (por ejemplo, el aminoácido Fmoc) puede acoplarse a la resina de 2-clorotritilo en diclorometano con la adición de DIEA, con unos tiempos de reacción de 10 a 120 minutos, por ejemplo, 20 minutos, pero no se limita al uso de este disolvente y esta base.

El acoplamiento sucesivo de los aminoácidos protegidos puede realizarse según métodos convencionales en la síntesis de péptidos, generalmente en un sintetizador de péptidos automático. Después de la escisión de grupo protector N α -Fmoc del aminoácido acoplado sobre la fase sólida mediante un tratamiento, por ejemplo, con piperidina (del 10% al 50%) en dimetilformamida durante 5 a 20 minutos, por ejemplo, 2x2 minutos con piperidina al 50% en DMF y 1x15 minutos con piperidina al 20% en DMF, se acopla el siguiente aminoácido protegido en un exceso de 3 a 10 veces, por ejemplo, en un exceso de 10 veces, al aminoácido previo en un disolvente polar, no acuoso e inerte, tal como diclorometano, DMF o mezclas de los dos, y a unas temperaturas de entre aproximadamente 10 °C y 50 °C, por ejemplo, a 25 °C. Los reactivos previamente mencionados para el acoplamiento del primer N α -Fmoc-aminoácido al anclaje de PAL, Wang o Rink son adecuados como reactivos de acoplamiento. Como alternativa, también pueden usarse los ésteres activos del aminoácido protegido, o sus cloruros, fluoruros o anhídridos asimétricos.

Al final de la síntesis en fase sólida, el péptido se escinde del material de soporte mientras que, al mismo tiempo, se escinden los grupos protectores de cadena lateral. La escisión puede realizarse con ácido trifluoroacético u otro medio muy ácido, con la adición de 5%-20% en v/v de captadores, tales como dimetilsulfuro, etilmetilsulfuro,

- 5 tioanisol, tiocresol, m-cresol, anisol, etanditiol, fenol o agua, por ejemplo, dimetilsulfuro al 15% en v/v/etanditiol/m-cresol 1:1:1, dentro de 0,5 a 3 horas, por ejemplo, 2 horas. Los péptidos con cadenas laterales completamente protegidas se obtienen escindiendo el anclaje de 2-clorotritilo con ácido acético glacial/trifluoroetanol/diclorometano 2:2:6. El péptido protegido puede purificarse mediante una cromatografía en gel de sílice. Si el péptido está unido a la fase sólida a través del anclaje de Wang y si se pretende obtener un péptido con una alquilamidación C-terminal, la escisión puede realizarse mediante aminólisis con una alquilamina o fluoroalquilamina. La aminólisis se realiza a unas temperaturas de entre aproximadamente -10 °C y 50 °C (por ejemplo, aproximadamente 25 °C), y unos tiempos de reacción de entre aproximadamente 12 y 24 horas (por ejemplo, aproximadamente 18 horas). Además, el péptido puede escindirse del soporte mediante reesterificación, por ejemplo, con metanol.
- 10 La disolución ácida que se obtiene puede mezclarse con una cantidad en 3 a 20 veces de éter frío o n-hexano, por ejemplo, un exceso en 10 veces de éter dietílico, para precipitar el péptido y, por tanto, separar los captadores y los grupos protectores escindidos que permanecen en el éter. Puede realizarse otra purificación volviendo a precipitar el péptido varias veces en ácido acético glacial. El precipitado que se obtiene puede suspenderse en agua o terc-butanol o en mezclas de los dos disolventes, por ejemplo, una mezcla 1:1 de terc-butanol/agua, y liofilizarse.
- 15 El péptido obtenido puede purificarse mediante diversos métodos cromatográficos, que incluyen el intercambio iónico sobre una resina débilmente básica en la forma de acetato; cromatografía de adsorción hidrófoba sobre copolímeros de poliestireno/divinilbenceno no derivatizados (por ejemplo, Amberlite® XAD); cromatografía de adsorción sobre gel de sílice; cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, sobre carboximetilcelulosa; cromatografía de distribución, por ejemplo sobre Sephadex® G-25; cromatografía de distribución a contracorriente; o cromatografía líquida de alta presión (HPLC), por ejemplo, HPLC en fase inversa sobre fases de octilo u octadecilsililsílice (ODS).
- 20

B. Producción recombinante

- 25 Cuando un polipéptido se produce usando técnicas recombinantes, el polipéptido puede producirse como una proteína intracelular o como una proteína segregada, usando cualquier construcción adecuada y cualquier célula hospedante adecuada, que puede ser una célula procariota o eucariota, tal como una célula hospedante bacteriana (por ejemplo, *E. coli*) o de levadura, respectivamente. Otros ejemplos de células eucariotas que pueden usarse como células hospedantes incluyen células de insecto, células de mamífero y/o células vegetales. Cuando se emplean células hospedantes de mamífero, estas pueden incluir células humanas (por ejemplo, células HeLa, 293, H9 y Jurkat); células de ratón (por ejemplo, NIH3T3, células L y células C127); células de primate (por ejemplo, Cos 1, Cos 7 y CV1) y células de hámster (por ejemplo, células de ovario de hámster chino ("Chinese hamster ovary", CHO)).
- 30

- 35 Puede emplearse una diversidad de sistemas de hospedante-vector para la expresión de un polipéptido, según procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, Nueva York; y Ausubel *et al.*, 1995, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Wiley and Sons. Los métodos para la introducción de material genético en células hospedantes incluyen, por ejemplo, transformación, electroporación, conjugación, métodos de fosfato de calcio y similares. El método para la transferencia puede seleccionarse para que proporcione una expresión estable del ácido nucleico que codifica un polipéptido introducido. El ácido nucleico que codifica un polipéptido puede proporcionarse como un elemento episómico heredable (por ejemplo, un plásmido) o puede integrarse en el genoma. En el mercado están disponibles una diversidad de vectores apropiados para su uso en la producción de un polipéptido de interés.
- 40

- 45 Los vectores pueden proporcionar el mantenimiento extracromosómico en una célula hospedante o pueden proporcionar la integración en el genoma de la célula hospedante. El vector de expresión proporciona secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales, y puede proporcionar la expresión inducible o constitutiva cuando la región codificadora se une operablemente bajo el control transcripcional de la región de inicio de la transcripción y una región de fin de la transcripción y la traducción. En general, las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales pueden incluir, pero no se limitan a secuencias de promotores, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y fin de la transcripción, secuencias de inicio y fin de la traducción, y secuencias de potenciadores o activadores. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, y pueden ser un promotor constitutivo fuerte (por ejemplo, T7).
- 50

- 55 Las construcciones de expresión en general contienen sitios de restricción convenientes localizados cerca de la secuencia del promotor para proporcionar la inserción de secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas de interés. Puede estar presente un marcador seleccionable operativo en el hospedante de expresión para facilitar la selección de células que contienen el vector. Además, la construcción de expresión puede incluir otros elementos. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener uno o dos sistemas de replicación, lo cual permite que se mantenga dentro de los organismos, por ejemplo, en células de mamífero o de insecto para la expresión, y en un hospedante procariota para la clonación y la amplificación. Además, la construcción de expresión puede contener un gen de un marcador seleccionable para permitir la selección de las células hospedantes transformadas. Los genes seleccionables son muy conocidos en la técnica y varían según la célula hospedante usada.

El aislamiento y la purificación de una proteína puede lograrse según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una proteína puede aislarse a partir de un lisado de células genéticamente modificadas para que expresen la proteína de modo constitutivo y/o tras una inducción, o a partir de una mezcla de reacción sintética mediante una purificación de inmunofinidad, que en general implica poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti proteína, lavar para retirar el material que no se unió específicamente, y eluir la proteína unida específicamente. La proteína aislada puede purificarse aún más mediante diálisis y otros métodos que se emplean normalmente en los métodos de purificación de proteínas. En una realización, la proteína puede aislarse usando métodos de cromatografía de quelados metálicos. Las proteínas pueden contener modificaciones para facilitar el aislamiento.

Los polipéptidos pueden prepararse en una forma sustancialmente pura o en una forma aislada (por ejemplo, exentos de otros polipéptidos). Los polipéptidos pueden estar presentes en una composición que esté enriquecida en el polipéptido con relación a otros componentes que pueden estar presentes (por ejemplo, otros polipéptidos u otros componentes de la célula hospedante). Por ejemplo, puede proporcionarse un polipéptido purificado de modo que el polipéptido esté presente en una composición que está sustancialmente exenta de otras proteínas expresadas, por ejemplo, menos del 90%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5%, o menos del 1% de la composición está formada por otras proteínas expresadas.

Usos terapéuticos y profilácticos

En la presente se describen métodos para tratar o prevenir la hiperglucemia, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, trastornos del metabolismo de la glucosa, obesidad y otros trastornos del peso corporal, así como otras enfermedades, afecciones y trastornos metabólicos y asociados con el metabolismo, mediante la administración de los agentes o sus composiciones. Además, tal como se describe en la presente, la presente descripción proporciona métodos para tratar o prevenir un conjunto de otras enfermedades, afecciones y trastornos. Estos métodos también pueden tener un efecto ventajoso sobre uno o más síntomas asociados con una enfermedad, una afección o un trastorno, por ejemplo, disminuyendo la gravedad o la frecuencia de un síntoma. En ciertas realizaciones, el método es un método para tratar una enfermedad o un trastorno. En otras realizaciones, el método es un método para prevenir una enfermedad o un trastorno.

En ciertas realizaciones, la presente descripción contempla métodos para tratar (o prevenir, en ciertas circunstancias) un sujeto que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho método proporcionar un sujeto que padece un trastorno metabólico, en el que el sujeto muestra un indicio de un trastorno canceroso inducido por FGF19, y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19 identificado a partir de una agrupación de polipéptidos de variantes de FGF19 candidatos, según se describe en la presente; en el que se produce una mejora en el trastorno metabólico en el sujeto.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades, afecciones y trastornos incluyen: 1) trastornos de utilización de la glucosa y sus secuelas asociadas, que incluyen diabetes mellitus (de tipo I y de tipo 2), diabetes gestacional, hiperglucemia, resistencia a la insulina, metabolismo anómalo de la glucosa, "prediabetes" (alteración de la glucosa en ayunas, "Impaired Fasting Glucose", IFG) o tolerancia alterada a la glucosa ("Impaired Glucose Tolerance", IGT)), y otros trastornos fisiológicos asociados o que surgen del trastorno hiperglucémico que incluyen, por ejemplo, cambios histopatológicos, tales como la destrucción de células β pancreáticas. Otros trastornos relacionados con la hiperglucemia incluyen lesiones en riñones (por ejemplo, lesiones en los túbulos o nefropatía), degeneración hepática, lesiones oculares (por ejemplo, retinopatía diabética o cataratas), y trastornos diabéticos del pie; 2) dislipidemias y sus secuelas, tales como, por ejemplo, aterosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria, trastornos cerebrovasculares y similares; 3) otros trastornos que pueden asociarse al síndrome metabólico, tales como obesidad y una elevada masa corporal (incluyendo sus trastornos comórbidos, tales como, pero sin limitarse a enfermedad del hígado graso no alcohólico ("nonalcoholic fatty liver disease", NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica ("nonalcoholic steatohepatitis", NASH), y síndrome del ovario poliquístico ("polycystic ovarian syndrome", PCOS)), y también incluyen trombosis, estados hipercoagulables y protrombóticos (arteriales y venosos), hipertensión, enfermedad cardiovascular, ictus e insuficiencia cardíaca; 4) trastornos o afecciones en los que están implicadas reacciones inflamatorias, que incluyen aterosclerosis, enfermedades del intestino inflamatorias crónicas (por ejemplo, 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 que incluyen, por ejemplo, liposarcomas, tumores sólidos y neoplasmas; 6) enfermedades neurodegenerativas y/o trastornos desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico y/o enfermedades neurológicas que implican procesos neuroinflamatorios y/u otras neuropatías periféricas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, leucoencefalopatía multifocal progresiva y síndrome de Guillain-Barre; 7) trastornos de la piel y dermatológicos y/o trastornos de procesos de curación de heridas, que incluyen dermatosis eritematoescamosas; y 8) otros trastornos, tales como el síndrome X, osteoartritis, y síndrome de insuficiencia respiratoria agudo.

Para determinar si un sujeto puede ser un candidato para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa y/o trastornos de la glucosa mediante los métodos proporcionados en la presente, pueden utilizarse diversos métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, evaluación de la glucosa en plasma en ayunas (FPG) y ensayo de tolerancia a la glucosa oral ("oral glucose tolerance test", oGTT)).

Para determinar si un sujeto puede ser un candidato para el tratamiento o la prevención de un trastorno del peso corporal (por ejemplo, obesidad) mediante los métodos proporcionados en la presente, deben evaluarse parámetros tales como, pero sin limitarse a la etiología y el grado del trastorno del sujeto (por ejemplo, la comparación del sobrepeso del sujeto con referencia un individuo sano). Por ejemplo, un adulto que tiene un BMI entre aproximadamente 25 y aproximadamente 29,9 kg/m² puede considerarse con sobrepeso (preobeso), mientras que un adulto que tienen un BMI de aproximadamente 30 kg/m² o mayor puede considerarse obeso. Para los sujetos que tienen sobrepeso y/o que consumen una dieta mala (por ejemplo, dietas con alto contenido en grasas y calorías), es habitual inicialmente poner en práctica y evaluar el efecto de la modificación de los hábitos alimentarios y/o regímenes de ejercicio antes de iniciar una terapia que comprenda uno o más de los polipéptidos de la presente descripción.

En la presente también se describe un método para tratar un sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano) que padece una enfermedad, una afección o un trastorno metabólico o asociado al metabolismo, comprendiendo dicho método: (i) determinar si un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar un sujeto de estudio que presenta un indicio de un trastorno canceroso, y el sujeto padece un trastorno metabólico, (b) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un variante de FGF19 al sujeto de estudio, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y (c) determinar si un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio se incrementa; en el que la ausencia de incremento de un indicio de un trastorno canceroso indica que el sujeto de estudio es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19; y en el que si no aumenta el indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio, entonces el método comprende además (ii) administrar posteriormente el variante de FGF19 al sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano). En ciertos casos, la administración posterior del variante de FGF19 es una cantidad terapéuticamente eficaz que da como resultado el tratamiento de la enfermedad, la afección o el trastorno metabólico o asociado al metabolismo en el sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano).

En la presente también se proporciona un método para tratar un sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano) que padece una enfermedad, una afección o un trastorno metabólico o asociado al metabolismo, comprendiendo dicho método: (i) determinar si un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar un sujeto de estudio que presenta un indicio de un trastorno canceroso, y el sujeto padece un trastorno metabólico, y (b) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un variante de FGF19 al sujeto de estudio, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y (c) determinar si un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio se reduce; en el que la reducción de un indicio de un trastorno canceroso indica que el sujeto de estudio es un candidato para el tratamiento con un variante de FGF19; y en el que si aparece una reducción del indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio, entonces el método comprende además (ii) administrar posteriormente el variante de FGF19 al sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano). En ciertas realizaciones, la administración posterior del variante de FGF19 es una cantidad terapéuticamente eficaz que da como resultado el tratamiento de la enfermedad, la afección o el trastorno metabólico o asociado al metabolismo en el sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano).

En la presente también se describe un método para tratar un sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano) que padece una enfermedad, una afección o un trastorno metabólico o asociado al metabolismo, comprendiendo dicho método: (i) determinar si un variante de FGF19 es un candidato para tratar un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho método: (a) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y el variante de FGF19 al sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para inducir un trastorno canceroso en una población de referencia, y (b) determinar si se observa un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio; en el que la ausencia de un indicio de un trastorno canceroso indica que el variante de FGF19 es un candidato para el tratamiento del sujeto de estudio; y en el que si el indicio de un trastorno canceroso está ausente, entonces el método comprende además (ii) administrar posteriormente el variante de FGF19 al sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano). En ciertos casos, la administración posterior del variante de FGF19 es una cantidad terapéuticamente eficaz que da como resultado el tratamiento de la enfermedad, la afección o el trastorno metabólico o asociado al metabolismo en el sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano).

En la presente también se describe un método para tratar un sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano) que padece una enfermedad, una afección o un trastorno metabólico o asociado al metabolismo, comprendiendo dicho método: (i) determinar si un variante de FGF19 es un candidato para tratar un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar un sujeto de estudio que padece un trastorno metabólico, y el sujeto de estudio presenta un indicio de un trastorno canceroso, (b) coadministrar FGF19 o un sustituto de FGF19, y un variante de FGF19 al sujeto de estudio, en el que la cantidad de FGF19 o del sustituto de FGF19 administrada al sujeto de estudio es suficiente para exacerbar un trastorno canceroso en una población de referencia, y (c) determinar si un indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio se incrementa; en el que la ausencia de exacerbación de un indicio de un trastorno canceroso indica que el

variante de FGF19 es un candidato para el tratamiento del sujeto de estudio; y en el que si el indicio de un trastorno canceroso en el sujeto de estudio no se incrementa, entonces el método comprende además (ii) administrar posteriormente el variante de FGF19 al sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano). En ciertas realizaciones, la administración posterior del variante de FGF19 es una cantidad terapéuticamente eficaz que da como resultado el tratamiento de la enfermedad, la afección o el trastorno metabólico o asociado al metabolismo en el sujeto (por ejemplo, un animal, tal como un ser humano). En algunas realizaciones, uno o más indicios de un trastorno canceroso se reducen en el sujeto de estudio.

En la presente también se proporciona un variante de FGF19 para su uso en un método para tratar un trastorno canceroso en un sujeto que padece una enfermedad, una afección o un trastorno metabólico o asociado con el metabolismo, que comprende: (a) proporcionar un sujeto que padece un trastorno metabólico, en el que el sujeto muestra un indicio de un trastorno canceroso inducido por FGF19, y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19 identificado en uno cualquiera de los métodos o modelos proporcionados en la presente; en el que se produce una mejora en la enfermedad, la afección o el metabólico o asociado con el metabolismo en el sujeto.

En ciertas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente, el sujeto es un animal. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el trastorno canceroso es un tumor. En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor de colon o un tumor hepático. En algunas realizaciones, la enfermedad, la afección o el trastorno metabólico o asociado con el metabolismo es un trastorno metabólico. En algunas realizaciones, el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en un trastorno hiperglucémico, la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa, la obesidad y el síndrome metabólico. En una realización, el trastorno hiperglucémico es la diabetes. En otra realización, el tratamiento provoca una mejora en el trastorno metabólico. En ciertas realizaciones, la mejora del trastorno metabólico es una disminución de la glucosa en sangre. En otras realizaciones, la mejora del trastorno metabólico en el sujeto es una disminución del peso corporal. En ciertas realizaciones, la mejora del trastorno metabólico en el sujeto es una disminución de la insulina.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un variante de FGF19 para su uso en un método para tratar o prevenir un cáncer o tumor dependiente de FGF19 por medio de antagonizar la actividad oncogénica de FGF19, por ejemplo, usando un variante de FGF19 proporcionado en la presente. En algunas realizaciones, una célula que expresa FGF19 se pone en contacto con un variante de FGF19 proporcionado en la presente. En algunas realizaciones, el variante de FGF19 es M70. En ciertas realizaciones, en la presente se proporciona un método para antagonizar la actividad oncogénica de FGF19 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19, antagonizando con ello la actividad oncogénica de FGF19 en el sujeto. En algunas realizaciones, se proporciona un método para prevenir una enfermedad, una afección o un trastorno dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19, previniendo con ello la enfermedad, la afección, el trastorno o uno de sus síntomas en el sujeto. En otras realizaciones, se proporciona un método para tratar una enfermedad, una afección o un trastorno dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19, tratando con ello la enfermedad, la afección, el trastorno o uno de sus síntomas en el sujeto.

En ciertas realizaciones, el sujeto padece una enfermedad metabólica y/o presenta un indicio de un trastorno canceroso. Según la invención, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor. En algunas realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de hígado, de colon, de próstata o de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer o tumor es benigno. En otras realizaciones, el cáncer o tumor es maligno.

En ciertas realizaciones, el sujeto padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, una afección o un trastorno dependiente de FGF19. En algunos casos, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 es una enfermedad, afección o trastorno hepático (hepatocelular), tal como cirrosis o colestasis. En algunos casos, la enfermedad o el trastorno hepático es una enfermedad o trastorno hepático crónico. Según la invención, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor, tal como HCC. En otras realizaciones, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 no es una enfermedad, afección o trastorno hepático, tal como cirrosis o colestasis. En algunos casos, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 no es un cáncer o tumor, tal como HCC. En algunas realizaciones, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor de colon. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor de colon es un adenocarcinoma de colon. En algunas realizaciones, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor de próstata. En otras realizaciones, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor de pulmón. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor de pulmón es un carcinoma de células escamosas de pulmón. En algunas realizaciones, el FGF19 se expresa en una célula de cáncer o tumor primaria o metastásica. En ciertas realizaciones, la enfermedad, la afección o el trastorno dependiente de FGF19 es precanceroso. Por ejemplo, la cirrosis y la colestasis a veces conducen a cánceres hepáticos, tales como HCC, y se contemplan métodos para tratar o prevenir dichas enfermedades y trastornos hepáticos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto que necesita de prevención o tratamiento. En algunas realizaciones, la administración del variante de FGF19 mantiene la homeostasis del ácido biliar en el sujeto.

En la presente se proporciona un método para tratar un cáncer o tumor, tal como un cáncer o tumor dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19. En ciertas realizaciones, la administración produce una mejora en cáncer, tumor, o en uno de sus síntomas, en el sujeto. En algunas realizaciones, el método produce una reducción en número de tumores, el tamaño tumoral o el peso tumoral. En la presente también se proporciona un método para prevenir un cáncer o tumor, tal como un cáncer o tumor dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un variante de FGF19. En algunas realizaciones, la administración produce la prevención del cáncer, tumor, o en uno de sus síntomas, en el sujeto. En algunas realizaciones, el método produce una reducción en número de tumores, el tamaño tumoral o el peso tumoral. En una realización específica, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor dependiente de FGF19. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor es un carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones, el cáncer o tumor no es un carcinoma hepatocelular. En una realización, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de colon. En algunas realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de próstata. En ciertas realizaciones, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de pulmón. El variante de FGF19 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el variante de FGF19 es un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto que lo necesita.

Se entiende que cualquiera de los métodos terapéuticos o profilácticos proporcionados en la presente puede usarse junto con cualquiera de los modelos u otros métodos proporcionados en la presente.

En los métodos descritos en la presente, el variante de FGF19 puede seleccionarse del grupo que consiste en M5, M6, M7, M14, M15, M32, M36, M43, M52, M53, M67, M68, M69, M70, M75, M76, M77, M83, M84, M140, M144, M145, M146 y M160. En algunas realizaciones, el variante de FGF19 es M70. En algunos casos, también se contempla cualquier combinación de dos o más de los anteriores variantes de FGF19.

En algunas aplicaciones de los métodos descritos en la presente, el variante de FGF19 comprende una secuencia de aminoácidos indicada en una cualquiera de SEQ ID NO:5-29; o una de sus subsecuencias o fragmentos. En otras aplicaciones de los métodos descritos en la presente, el variante de FGF19 comprende una secuencia de aminoácidos indicada en una cualquiera de SEQ ID NO:5-29; o una de sus subsecuencias o fragmentos. En ciertos casos, el resto R N-terminal está deletado. De SEQ ID NO:7. En otras realizaciones, el variante FGF19 comprende o consiste en SEQ ID NO:8. En algunos casos, el variante de FGF19 comprende o consiste en una subsecuencia de cualquiera de las anteriores secuencias. En otros casos, también se contempla cualquier combinación de dos o más de los anteriores variantes de FGF19.

Composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente descripción pueden estar en forma de composiciones adecuadas para la administración a un sujeto. En general, estas composiciones son "composiciones farmacéuticas" que comprenden uno o más polipéptidos y uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables. En ciertas realizaciones, los polipéptidos están presentes en una cantidad terapéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden usarse en los métodos de la presente descripción; así, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse *ex vivo* o *in vivo* a un sujeto para practicar los métodos y los usos terapéuticos y profilácticos descritos en la presente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden formularse para que sean compatibles con el método o vía de administración previstos; a continuación se indican ejemplos de vías de administración. Además, las composiciones farmacéuticas pueden usarse en combinación con otros agentes o compuestos terapéuticamente activos (por ejemplo, agentes para disminuir la glucosa) como se describe en la presente para tratar o prevenir las enfermedades, las afecciones y los trastornos, tal como contempla la presente descripción.

Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los polipéptidos contemplados por la presente descripción, y uno o más agentes de formulación fisiológica y farmacéuticamente aceptables. Los diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico y bisulfato de sodio), conservantes (por ejemplo, alcohol bencílico, metilparabenos, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo), agentes emulgentes, agentes suspensores, agentes dispersantes, disolventes, cargas, agentes de relleno, detergentes, tampones, vehículos, diluyentes y/o adyuvantes. Por ejemplo, un vehículo adecuado puede ser disolución salina fisiológica o disolución salina tamponada con citrato, quizá suplementada con otros materiales habituales en las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral. La disolución salina tamponada neutra o la disolución salina mezclada con albúmina de suero son otros ejemplos de vehículos. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad una diversidad de tampones que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación. Los tampones típicos incluyen, pero no se limitan a ácidos débiles farmacéuticamente aceptables, bases débiles farmacéuticamente aceptables o sus mezclas. Como ejemplo, los componentes del tampón pueden ser materiales hidrosolubles, tales como ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido glutámico y sus sales. Los agentes tamponantes aceptables incluyen, por ejemplo, tampón Tris, ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etansulfónico) (HEPES), ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES), sal de sodio del ácido 2-(N-

morfolino)etansulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propansulfónico (MOPS), y ácido N-tris[hidroximetil]metil-3-aminopropansulfónico (TAPS).

Tras haber formulado una composición farmacéutica, esta puede conservarse en viales estériles en forma de una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido o polvo deshidratado o liofilizado. Estas formulaciones pueden conservarse en una forma lista para usar, una forma liofilizada que debe reconstituirse antes del uso, una forma líquida que debe diluirse antes del uso u otra forma aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se proporciona en un recipiente de un solo uso (por ejemplo, un vial, ampolla, jeringa o autoinyector (similar, por ejemplo, a un EpiPen®) de un solo uso), mientras que en otras realizaciones se proporciona un recipiente de múltiples usos (por ejemplo, un vial de múltiples usos). Puede emplearse cualquier aparato de administración de fármacos para administrar los polipéptidos, que incluyen implantes (por ejemplo, bombas implantables) y sistemas de catéteres, siendo ambos conocidos por los expertos en la técnica. También pueden usarse inyecciones depot (depósito de liberación lenta), que en general se administran por vía subcutánea o intramuscular, para liberar los polipéptidos descritos en la presente a lo largo de un periodo de tiempo definido. Las inyecciones depot habitualmente tienen una base sólida o de aceite y en general comprenden al menos uno de los componentes de formulación indicados en la presente. Los expertos en la técnica están familiarizados con las posibles formulaciones y usos de las inyecciones depot. En ciertas realizaciones, se contempla el uso de la tecnología de administración depot de Nano Precision Medical (Nano Precision Medical; Emeryville, Calif.). La tecnología utiliza una membrana de nanotubos de óxido de titanio que produce unas tasas de liberación de orden cero de macromoléculas, tales como productos terapéuticos de proteínas y péptidos. La membrana biocompatible está alojada en un pequeño implante subcutáneo que proporciona una administración a largo plazo (por ejemplo, de hasta un año) y a una tasa constante de macromoléculas terapéuticas. La tecnología se está evaluando en la actualidad, por ejemplo, para la administración de agonistas de GLP-1 para el tratamiento de la diabetes de tipo II.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes y los agentes suspensores adecuados mencionados en la presente. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butandiol. Los diluyentes, disolventes y medios de dispersión aceptables que pueden emplearse incluyen agua, disolución de Ringer, disolución de cloruro de sodio isotónica, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o disolución salina tamponada con fosfato ("phosphate buffered saline", PBS), etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y sus mezclas adecuadas. Además, de modo convencional se emplean aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, pueden usarse ácidos grasos, tales como ácido oleico, en la preparación de inyectables. La absorción prolongada de formulaciones inyectables en partículas puede lograrse incluyendo un agente que retrase la absorción (por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina).

Las composiciones farmacéuticas que contienen el ingrediente activo pueden estar en una forma adecuada para un uso oral, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes, disoluciones, microesferas o elixires. Las composiciones farmacéuticas previstas para un uso oral pueden prepararse según cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas, y estas composiciones pueden contener uno o más agentes tales como, por ejemplo, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes para proporcionar preparaciones de sabor agradable y farmacéuticamente atractivas. Los comprimidos, las cápsulas y similares contienen el ingrediente activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregación, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido alginico; agentes ligantes, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Los comprimidos, las cápsulas y similares adecuados para la administración oral pueden no estar revestidos o pueden revestirse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y, con ello, proporcionar una acción sostenida. Por ejemplo, puede emplearse un material de retraso en el tiempo, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También pueden revestirse mediante técnicas conocidas en la técnica para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para la liberación controlada. Otros agentes incluyen partículas biodegradables o biocompatibles o una sustancia polimérica, tales como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogel, polivinilpirrolidona, polianhídridos, poli(ácido glicólico), etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina, o copolímeros de lactida/glicólido, copolímeros de polilactida/glicólido, o copolímeros de etileno-acetato de vinilo, para controlar la administración de una composición administrada. Por ejemplo, el agente oral puede encerrarse en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, usando microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina, o microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, o en un sistema de transporte de fármacos coloidal. Los sistemas de dispersión coloidales incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, y sistemas basados en lípidos, que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Se

describen métodos para preparar liposomas, por ejemplo, en las patentes patente de EE. UU. n.ºs 4.235.871, 4.501.728, y 4.837.028. Los métodos para la preparación de las formulaciones mencionadas anteriormente serán evidentes para los expertos en la técnica.

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

10 Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para su fabricación. Estos excipientes pueden ser agentes suspensoros, por ejemplo, carboximetilcelulosa sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes, por ejemplo, una fosfatida natural (por ejemplo, lecitina), o productos de la condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos (por ejemplo, estearato de polioxietileno), o productos de la condensación del óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga (por ejemplo, para heptadecaetilenoxicetanol), o productos de la condensación del óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitol), o productos de la condensación del óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol (por ejemplo, monooleato de polietilensorbitano). Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes.

20 Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral, tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes, tales como los indicados anteriormente, y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral de sabor agradable.

25 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente suspensor y uno o más conservantes. En la presente se presentan ejemplos de agentes dispersantes o humectantes y agentes suspensoros adecuados.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida, o mezclas de estos. Los agentes emulgentes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo, goma arábiga 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 sorbitano; y productos de la condensación de ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitano.

35 Las formulaciones también pueden incluir vehículos para proteger la composición frente a la degradación rápida o la eliminación del cuerpo, tales como como una formulación de liberación controlada, que incluyen implantes, liposomas, hidrogeles, profármacos y sistemas de transporte microencapsulados. Por ejemplo, puede emplearse un material de retraso en el tiempo, tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo por sí solos o en combinación con una cera.

40 La presente descripción contempla la administración de los polipéptidos en forma de supositorios para la administración rectal del fármaco. Los supositorios pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólida a temperaturas normales, pero líquido a la temperatura rectal y, por tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Estos materiales incluyen, pero no se limitan a manteca de cacao y polietilenglicoles.

45 Los polipéptidos contemplados por la presente descripción pueden estar en forma de cualquier otra composición farmacéutica adecuada (por ejemplo, pulverizados para un uso nasal o por inhalación) que se conocen en la actualidad o que se desarrollen en el futuro.

50 La concentración de un polipéptido, o uno de sus fragmentos, en la formulación puede variar mucho (por ejemplo, desde menos de aproximadamente 0,1%, habitualmente al o al menos aproximadamente 2% hasta una cantidad del 20% al 50% o más en peso) y normalmente se seleccionará basándose principalmente en los volúmenes del fluido, las viscosidades y factores relacionados con el sujeto, por ejemplo, según la vía de administración concreta seleccionada.

Vías de administración

55 La presente descripción contempla la administración de los polipéptidos descritos, y sus composiciones, de cualquier manera apropiada. Las vías de administración adecuadas incluyen la vía parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa, subcutánea (por ejemplo, inyección o implante), intraperitoneal, intracisternal, intraarticular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimática) e intracerebroventricular), oral, nasal, vaginal, sublingual, intraocular, rectal, tópica (por ejemplo, transdérmica), sublingual y por inhalación.

También pueden usarse inyecciones depot (depósito de liberación lenta), que en general se administran por vía subcutánea o intramuscular, para liberar los polipéptidos descritos en la presente a lo largo de un periodo de tiempo definido. Las inyecciones depot habitualmente tienen una base sólida o de aceite y en general comprenden al menos uno de los componentes de formulación indicados en la presente. Los expertos en la técnica están familiarizados con las posibles formulaciones y usos de las inyecciones depot.

Con respecto a los anticuerpos, en un ejemplo de realización, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la presente descripción puede conservarse a 10 mg/ml en disolución salina acuosa isotónica estéril para la inyección a 4 °C, y se diluye en 100 ml o 200 ml de cloruro de sodio al 0,9% para la inyección antes de la administración al sujeto. El anticuerpo se administra mediante una infusión intravenosa a lo largo de 1 hora a una dosis de entre 0,2 y 10 mg/kg. En otros casos, el anticuerpo se administra mediante una infusión intravenosa a lo largo de un periodo de entre 15 minutos y 2 horas. En otros casos, el procedimiento de administración se realiza mediante una inyección en embolada subcutánea.

Terapia de combinación

La presente descripción contempla el uso de los polipéptidos de variantes de FGF19 identificados en la presente en combinación con uno o más agentes terapéuticos activos u otras modalidades profilácticas o terapéuticas. En esta terapia de combinación, con frecuencia los diversos agentes activos tienen diferentes mecanismos de acción. Esta terapia de combinación puede ser especialmente ventajosa ya que permite una reducción de la dosis de uno o más agentes, reduciendo o eliminando con ello los efectos adversos asociados con uno o más de los agentes; además, dicha terapia de combinación puede tener un efecto terapéutico o profiláctico sinérgico sobre la enfermedad, la afección o el trastorno subyacente.

Tal como se emplea en la presente, una “combinación” incluye terapias que pueden administrarse por separado, por ejemplo, pueden formularse por separado para la administración separada (por ejemplo, tal como se proporcionan en un kit), y terapias que pueden administrarse juntas en una única formulación (es decir, una “coformulación”). Las combinaciones de los polipéptidos identificados usando los métodos y los modelos descritos en la presente con uno o más agentes terapéuticos activos u otras modalidades profilácticas o terapéuticas pueden administrarse o aplicarse de modo secuencial (por ejemplo, cuando un agente se administra antes de uno o más agentes distintos) o simultáneo (por ejemplo, cuando dos o más agentes se administran al mismo tiempo o aproximadamente al mismo tiempo). Independientemente de que los dos o más agentes se administren de modo secuencial o simultáneo, se considera que se administran en combinación para los objetivos de la presente descripción.

Por consiguiente, los métodos y los usos de los polipéptidos identificados por medio del uso de los métodos y los modelos descritos en la presente pueden practicarse antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de otro tratamiento, y pueden suplementarse con otras formas de terapia. Las terapias suplementarias incluyen otros tratamientos para disminuir la glucosa y/o para perder peso, tales como insulina, un potenciador de la sensibilidad a la insulina y otros tratamientos con fármacos, un cambio en la dieta (disminuir los azúcares, las grasas, etc.), cirugía de pérdida de peso (reducir el volumen del estómago mediante derivación gástrica, gastrectomía), banda gástrica, balón gástrico, manga gástrica, etc.

La presente descripción contempla una terapia de combinación con numerosos agentes (y sus clases), que incluyen 1) insulina, miméticos de insulina y agentes que implican la estimulación de la secreción de insulina, que incluyen sulfonilureas (por ejemplo, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, tolbutamida, gliburida, glimepirida, glipizida) y meglitinidas (por ejemplo, repaglinida (PRANDIN) y nateglinida (STARLIX)); 2) biguanidas (por ejemplo, metformina (GLUCOPHAGE)) y otros agentes que actúan estimulando la utilización de la glucosa, reduciendo la producción de glucosa hepática y/o disminuyendo la emisión de glucosa intestinal; 3) inhibidores de alfa-glucosidasa (por ejemplo, acarbose y miglitol) y otros agentes que frenan la digestión de carbohidratos y, por consiguiente, la absorción desde el intestino y la reducción de la hiperglucemia postprandial; 4) tiazolidindionas (por ejemplo, rosiglitazona (AVANDIA), troglitazona (REZULIN), pioglitazona (ACTOS), glipizida, balaglitazona, rivoglitazona, netoglitazona, troglitazona, englitazona, ciglitazona, adaglitazona, darglitazona, que potencian la acción de la insulina (por ejemplo, mediante la sensibilización a la insulina), estimulando así la utilización de la glucosa en tejidos periféricos; 5) péptidos similares al glucagón, que incluyen inhibidores de DPP-IV (por ejemplo, vildagliptina (GALVUS) y sitagliptina (JANUVIA)) y péptido 1 similar al glucagón (“Glucagon-Like Peptide-1”, GLP-1) y agonistas y análogos de GLP-1 (por ejemplo, exenatida (BYETTA y ITCA 650 (una bomba osmótica insertada por vía subcutánea que administra un análogo de exenatida a lo largo de un periodo de 12 meses; Intarcia, Boston, Mass.)); 6) y análogos resistentes a DPP-IV (miméticos de incretina), agonistas de PPAR gamma, agonistas de PPAR de acción dual, agonistas de PPAR de acción universal, inhibidores de PTP1B, inhibidores de SGLT, secretagogos de insulina, agonistas de RXR, inhibidores de la glucógeno sintasa quinasa-3, moduladores inmunológicos, agonistas del receptor beta-3 adrenérgico, inhibidores de 11beta-HSD1, y análogos de amilina.

Además, la presente descripción contempla una terapia de combinación con agentes y métodos para estimular la pérdida de peso, tales como agentes que estimulan el metabolismo o disminuyen el apetito, y con dietas modificadas y/o regímenes de ejercicio para estimular la pérdida de peso. Los fármacos supresores del apetito son muy conocidos y pueden usarse en combinación con los métodos proporcionados en la presente.

Los polipéptidos de variantes de FGF19 de la presente descripción pueden usarse en combinación con uno o más agentes distintos de cualquier manera apropiada según las circunstancias. En una realización, el tratamiento con dicho al menos un agente activo y al menos un polipéptido de la presente descripción se mantiene a lo largo de un periodo de tiempo. En otra realización, el tratamiento con dicho al menos un agente activo se reduce o se detiene (por ejemplo, cuando el sujeto se estabiliza), mientras que el tratamiento con el polipéptido de la presente descripción se mantiene a un régimen de dosificación constante. En otra realización, el tratamiento con dicho al menos un agente activo se reduce o se detiene (por ejemplo, cuando el sujeto se estabiliza), mientras que el tratamiento con el polipéptido de la presente descripción se reduce (por ejemplo, una dosis menor, una dosificación menos frecuente o un régimen de tratamiento más corto). En otra realización, el tratamiento con dicho al menos un agente activo se reduce o se detiene (por ejemplo, cuando el sujeto se estabiliza), mientras que el tratamiento con el polipéptido de la presente descripción aumenta (por ejemplo, una dosis mayor, una dosificación más frecuente o un régimen de tratamiento más largo). En otra realización, el tratamiento con dicho al menos un agente activo se mantiene, y el tratamiento con el polipéptido de la presente descripción se reduce o se detiene (por ejemplo, una dosis menor, una dosificación menos frecuente o un régimen de tratamiento más corto). En otra realización, el tratamiento con dicho al menos un agente activo y el tratamiento con el polipéptido de la presente descripción se reducen o se detienen (por ejemplo, una dosis menor, una dosificación menos frecuente o un régimen de tratamiento más corto).

Dosificación

Los polipéptidos de la presente descripción pueden administrarse a un sujeto en una cantidad que depende, por ejemplo, del objetivo de la administración (por ejemplo, el grado de resolución deseado); la edad, el peso, el sexo y la salud y condición física del sujeto que se va a tratar; la naturaleza del polipéptido y/o la formulación que se está administrando; la vía de administración; y la naturaleza de la enfermedad, la afección, el trastorno o sus síntomas (por ejemplo, la gravedad de la desregulación de la glucosa/insulina y el estadio del trastorno). El régimen de dosificación también puede tomar en consideración la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto adverso asociado con el agente o agentes que se están administrando. Las cantidades de dosificación y regímenes de dosificación eficaces pueden determinarse con facilidad, por ejemplo, a partir de ensayos de escalada de dosis y de seguridad, estudios *in vivo* (por ejemplo, modelos animales), y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

En general, los parámetros de dosificación dictan que la cantidad de dosificación debe ser menor que una cantidad que sea irreversiblemente tóxica para el sujeto (es decir, la dosis máxima tolerada, "maximum tolerated dose", MTD) y no ser menor que una cantidad requerida para producir un efecto mensurable sobre el sujeto. Estas cantidades se determinan, por ejemplo, mediante los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos asociados con la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción ("ADME"), tomando en consideración la vía de administración y otros factores.

Una dosis eficaz ("effective dose", ED) es la dosis o la cantidad de un agente que produce una respuesta terapéutica o un efecto deseado en una fracción de los sujetos que la toman. La mediana de la dosis eficaz ("median effective dose" o ED50) de un agente es la dosis o la cantidad de un agente que produce una respuesta terapéutica o un efecto deseado en 50% de la población a la que se administra. Aunque la ED50 se emplea habitualmente como una medición de la esperanza razonable en el efecto de un agente, no es necesariamente la dosis que un médico pueda considerar apropiada, tomando en consideración todos los factores pertinentes. Así, en algunas situaciones, la cantidad eficaz es mayor que la ED50 calculada, en otras situaciones la cantidad eficaz es menor que la ED50 calculada, y en otras situaciones la cantidad eficaz es la misma que la ED50 calculada.

Además, una dosis eficaz de los polipéptidos de la presente descripción puede ser una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un sujeto, produce un resultado deseado con relación a un sujeto sano. Por ejemplo, una dosis eficaz puede ser una dosis que cuando se administra a un sujeto que presenta una cantidad elevada de glucosa en plasma y/o insulina en plasma, logra una reducción relativa deseada con relación a un sujeto sano en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, o más del 80%.

Un nivel de dosificación apropiado en general será de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal del paciente diarios, que puede administrarse en una sola dosis o en múltiples dosis. En algunas realizaciones, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg diarios, y en otras realizaciones de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10 mg/kg diarios. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg diarios, de aproximadamente 0,05 a 10 mg/kg diarios, o de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg diarios. Dentro de este intervalo, la dosificación puede ser de 0,005 a 0,05, de 0,05 a 0,5, o de 0,5 a 5,0 mg/kg diarios.

Para la administración de un agente oral, las composiciones pueden proporcionarse en forma de comprimidos, cápsulas y similares que contienen de 1,0 a 1000 miligramos del ingrediente activo, en particular 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 y 1000,0 miligramos del ingrediente activo. Los polipéptidos pueden administrarse en un régimen, por ejemplo de 1 a 4 veces

diarias, y a menudo una o dos veces diarias.

5 La dosificación de los polipéptidos de la presente descripción puede repetirse a una frecuencia apropiada, que puede estar en el intervalo de una vez diaria a una vez cada tres meses, dependiendo de la farmacocinética de los polipéptidos (por ejemplo, semivida) y la respuesta farmacodinámica (por ejemplo, la duración del efecto terapéutico del polipéptido). En algunas realizaciones, cuando el polipéptido es un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, o un polipéptidos o sus variantes, la dosificación se repite con frecuencia entre una vez semanal y una vez cada 3 meses. En otras realizaciones, dichos polipéptidos se administran aproximadamente una vez al mes.

10 En ciertas realizaciones, la dosificación de los polipéptidos descritos está contenida en una “forma de dosificación unitaria”. La expresión “forma de dosificación unitaria” se refiere unidades físicamente discretas, y cada unidad contiene una cantidad predeterminada de un polipéptido de la presente descripción, solo o en combinación con uno o más agentes adicionales, suficiente para producir el efecto deseado. Se apreciará que los parámetros de una forma de dosificación unitaria dependerán del agente concreto y del efecto que se va a lograr. Los ejemplos de dosis unitarias pueden variar de aproximadamente 25-250; 250-500; 500-1.000; 1.000-2.500; 2.500-5.000; 5.000-25.000; o 25.000-50.000 ng; o de aproximadamente 25-250; 250-500; 500-1.000; 1.000-2.500; 2.500-5.000; 5.000-25.000; 15 25.000-50.000 µg; o de aproximadamente 25-250; 250-500; 500-1.000; 1000-2.500; 2.500-5.000; 5.000-25.000; o 25.000-50.000 mg.

Pueden administrarse dosis individuales o dosis múltiples, por ejemplo, múltiples veces diarias, en días consecutivos, en días alternos, cada semana o de modo intermitente (por ejemplo, dos veces semanales, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 semanas, o una vez cada 2, 3, 4, 5 o 6 meses).

20 *Kits*

La presente descripción también contempla kits que comprenden los polipéptidos descritos, y sus composiciones farmacéuticas. Los kits en general están en forma de una estructura física que aloja diversos componentes, tal como se describe a continuación, y pueden utilizarse, por ejemplo, en la práctica de los métodos descritos anteriormente (por ejemplo, la administración de un polipéptido a un sujeto que necesita restablecer la homeostasis de la glucosa).

25 Un kit puede incluir uno o más de los polipéptidos descritos en la presente (proporcionados, por ejemplo, en un recipiente estéril) que puede estar en forma de una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto. Los polipéptidos pueden proporcionarse en una forma que esté lista para su uso o en una forma que requiera, por ejemplo, de reconstitución o dilución antes de la administración. Cuando los polipéptidos están en una forma que debe ser reconstituida por un usuario, el kit también puede incluir tampones, excipientes farmacéuticamente aceptable y similares, envasados junto con los polipéptidos o de manera separada. Cuando se 30 contempla una terapia de combinación, el kit puede contener los varios agentes por separado o pueden aparecer ya combinados en el kit. Cada componente del kit puede introducirse en un recipiente individual, y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de un único envase. Un kit de la presente invención puede diseñarse para las condiciones necesarias para mantener alojados los componentes en su interior de modo apropiado (por ejemplo, refrigeración o congelación).

Un kit puede contener una etiqueta o un inserto del envase que incluya información identificativa de los componentes en su interior e instrucciones para su uso (por ejemplo, parámetros de dosificación, farmacología clínica del ingrediente o ingredientes activos, incluyendo el mecanismo de acción, la farmacocinética y la farmacodinámica, los efectos adversos, las contraindicaciones, etc.). Las etiquetas o los insertos pueden incluir 40 información del fabricante, tal como el número de lote y la fecha de caducidad. La etiqueta o el inserto del envase puede integrarse, por ejemplo, en la estructura física que aloja los componentes, contenidos por separado dentro de la estructura física, o puede fijarse a un componente del kit (por ejemplo, una ampolla, un tubo o un vial). Los ejemplos de instrucciones incluyen las instrucciones para reducir o disminuir la glucosa en sangre, el tratamiento de la hiperglucemia, el tratamiento de la diabetes, etc., con los polipéptidos descritos, y sus composiciones farmacéuticas.

Las etiquetas o los insertos además pueden incluir o pueden incorporarse en un medio de lectura por ordenador, tal como un disco (por ejemplo, un disco duro, una tarjeta, un disco de memoria), un disco óptico, tal como CD- o DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, una cinta magnética, o un medio de almacenamiento electrónico, tal como RAM y ROM o híbridos de estos, tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos, medios FLASH o tarjetas de tipo 50 memoria. En algunas realizaciones, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones desde una fuente remota, por ejemplo, a través de internet.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque pueden emplearse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos 55 en la presente en la práctica o el ensayo de la invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados.

En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Tal como se emplean en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una secuencia de péptido" o un "tratamiento" incluye una pluralidad de dichas secuencias, tratamientos, etc. Se advierte además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Así, esta afirmación pretende servir como base antecedente para el uso de una terminología exclusiva, tal como "solamente," "solo" y similares, en conexión con la relación de los elementos de la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en este intervalo mencionado, está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también se incluyen dentro de la invención, sometidos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo mencionado. Cuando el intervalo mencionado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

Tal como se emplean en la presente, los valores numéricos a menudos se presentan en un formato de intervalo a lo largo de este documento. El uso de un formato de intervalo solo es por comodidad y brevedad, y no debe considerarse una limitación inflexible del alcance de la invención, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por consiguiente, el uso de un intervalo expresamente incluye todos los posibles subintervalos, todos los valores numéricos individuales dentro de este intervalo, y todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyendo los números enteros dentro de dichos intervalos y fracciones de los valores o los números enteros dentro de los 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. Así, por ejemplo, la referencia a un intervalo del 90-100% incluye 91-99%, 92-98%, 93-95%, 91-98%, 91-97%, 91-96%, 91-95%, 91-94%, 91-93%, etc. La referencia a un intervalo del 90-100% también incluye 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 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. Además, la referencia a un intervalo 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, 2500-5000, 5000-25.000, o 5000-50.000 incluye cualquier valor o intervalo numérico dentro de estos valores o que incluye dichos valores, por ejemplo, 25, 26, 27, 28, 29 . . . 250, 251, 252, 253, 254 . . . 500, 501, 502, 503, 504 . . . , etc. 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, tales como 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-75, 75-100, 100-150, incluye intervalos tales 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, etc.

Por concisión, en la presente se emplean ciertas abreviaturas. Un ejemplo es la abreviatura de una sola letra para representar restos aminoácidos. Los aminoácidos y sus correspondientes abreviaturas de tres letras y una sola letra 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)

5 La invención en general se describe en la presente usando un idioma afirmativo para describir las numerosas realizaciones. La invención también incluye específicamente realizaciones en las que un contenido concreto se excluye, totalmente o en parte, tales como sustancias o materiales, etapas del método y condiciones, protocolos, procedimientos, ensayos o análisis. Así, aunque la invención en general no se expresa en la presente en términos de lo que la invención no incluye, no obstante se describen en la presente aspectos que no se incluyen expresamente en la invención.

Parte experimental

10 Los siguientes ejemplos se ofrecen para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa y una descripción acerca de cómo preparar y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni pretenden representar que los siguientes experimentos son todos o son los únicos experimentos realizados. Se ha intentado asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben considerarse algunos errores experimentales y desviaciones.

15 A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderado, la temperatura es en grados Celsius (°C), y la presión es la atmosférica o cercana a esta. Se emplean abreviaturas convencionales, que incluyen las siguientes: pb = par o pares de bases; kb = kilobase o kilobases; pl = picolitro o picolitros; s o seg = segundo o segundos; min = minuto o minutos; h o hr = hora u horas; aa = aminoácido o aminoácidos; kb = kilobase o kilobases; nt = nucleótido o nucleótidos; ng = nanogramo; µg = microgramo; mg = miligramo; g = gramo; kg = kilogramo; dl = decilitro; µl = microlitro; l = litro; µM = micromolar; mM = milimolar; M = molar; kDa = kilodalton; i.m. = (por vía) intramuscular; i.p. = (por vía) intraperitoneal; s.c.= (por vía) subcutánea; bid = dos veces diarias; HPLC = cromatografía líquida de alta resolución; PC = peso corporal; U = unidad; ns = estadísticamente no significativo; PG = glucosa en plasma en ayunas; FPI = insulina en plasma en ayunas; ITT = ensayo de tolerancia a la insulina; PTT = ensayo de tolerancia al piruvato; oGTT = ensayo de tolerancia a la glucosa oral; GSIS = secreción de insulina estimulada por glucosa; AAV = virus adenoasociado; PBS = disolución salina tamponada con fosfato; PCR = reacción en cadena con polimerasa; NHS = N-hidroxisuccinimida; DMEM = modificación de Dulbecco del medio de Eagle; GC = copias del genoma; EDTA = ácido etilendiaminotetraacético; FGF19CF = FGF19 con el marcador FLAG en el extremo C-terminal; GFP = proteína fluorescente verde; ELISA = ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; ANOVA = análisis de la varianza; EEP = error estándar del promedio.

30 Ejemplo 1: Materiales y métodos para los ejemplos 2-5

Se emplearon los siguientes métodos y materiales en los siguientes ejemplos 2-5.

Animales.

35 Se mantuvieron ratones *db/db* (The Jackson Laboratory; Bar Harbor, Me.) de aproximadamente 15 semanas y con un peso de aproximadamente 36-48 g al inicio del tratamiento según las directrices de bienestar bajo condiciones controladas de luz (un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, la oscuridad desde 6:30 p.m.-6:30 a.m.), temperatura (22 ± 4 °C) y humedad (50% ± 20%). Los ratones podían acceder libremente a agua destilada tratada en autoclave y se alimentaron sin restricciones con un pienso del mercado (Harlan Laboratories, Indianápolis, Ind., Irradiated 2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet) que contenía 18 kcal % de grasas, 24 kcal % de proteínas y 58 kcal % de carbohidratos. Todos los estudios con animales fueron aprobados por the NGM Institutional Animal Care and Use Committee.

40

Secuencias de ácido nucleicos y de aminoácidos.

El ORF de FGF19 (ADNc del ORF que codifica hFGF19 (GenBank n.º de registro NM_005117.2) y la secuencia de proteína codificada por él (GenBank n.º de registro NP_005108.1)) se amplificaron mediante PCR usando ADN recombinante (ADNc) preparado a partir de tejido del intestino delgado humano. Se emplearon los kits de reactivos de PCR con ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® ((F-530L; New England BioLabs; Ipswich, MA) con los siguientes cebadores: cebador de PCR directo: 5' CCGACTAGTCACCatgaggagcggtgtgtgg (SEQ ID NO:40), y cebador de PCR inverso: 5' ATAAGAATGCGGCCGCTTACTTCTCAAAGCTGGGACTCCTC (SEQ ID NO:41).

El fragmento de ADN amplificado se digirió con Spe I y Not I (los sitios de restricción se incluyeron en los cebadores de PCR 5' o 3', respectivamente) y después se acopló con los vectores de transgenes de AAV que habían sido digeridos con las mismas enzimas de restricción. El vector usado para la expresión contenía un marcador seleccionable y un módulo de expresión compuesto de un promotor eucariota fuerte 5' de un sitio para la inserción de la secuencia codificadora clonada, seguido de una región no traducida 3' y una cola de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. La construcción de expresión también estaba flanqueada por repeticiones terminales internas en los extremos 5' y 3'.

Producción y purificación de AAV que codifican FGF19 y variantes de FGF19.

Se cultivaron células AAV293 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA.) en la modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM, Mediatech, Herndon, VA) suplementada con suero bovino fetal al 10% y 1× disolución de antibiótico-antimicótico (Mediatech). Las células se cultivaron a una densidad del 50% en el día 1 en placas de cultivo celular de 150 mm y se transfectaron en el día 2, usando el método de precipitación con fosfato de calcio, con los siguientes tres plásmidos (20 µg/placa de cada uno): i) plásmido de transgenes de AAV, ii) plásmidos pHelper (Agilent Technologies), y iii) plásmido de AAV2/9 (Rabinowitz *et al.*, 2002). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se rasparon de las placas, se sedimentaron mediante centrifugación a 3000×g y se resuspendieron en un tampón que contenía Tris 20 mM, pH 8,5, NaCl 100 mM y MgCl₂ 1 mM. La suspensión se congeló en un baño de hielo seco y alcohol y después se descongeló en un baño de agua de 37 °C; el ciclo de congelación-descongelación se repitió tres veces. Se añadió Benzonase® (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) hasta 50 unidades/ml y se añadió desoxicolato hasta una concentración final del 0,25%. Después de una incubación a 37 °C durante 30 minutos, los residuos celulares se sedimentaron mediante centrifugación a 5000×g durante 20 minutos. Las partículas víricas en el sobrenadante se purificaron usando un gradiente de iodixanal discontinuo (Sigma-Aldrich) como ha sido descrito previamente (Zolotukhin *et al.* (2002), *Endocrinology*, 143(5):1741-1747). La disolución madre vírica se concentró usando Vivaspin® 20 (límite de exclusión de peso molecular (PM) de 100.000 Da, Sartorius Stedim Biotech; Aubagne, Francia) y se resuspendió en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) con glicerol al 10% y se conservó a -80 °C.

Para determinar el número de copias del genoma (CG) vírico, se incubaron 2 µl de la disolución madre vírica en 6 µl de una disolución que contenía 50 unidades/ml de benzonasa, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, y CaCl₂ 10 mM a 37 °C durante 30 minutos. Después se añadieron 15 µl de una disolución que contenía 2 mg/ml de proteinasa K, SDS al 0,5%, y EDTA 25 mM, y la mezcla se incubó durante 20 minutos más a 55 °C para liberar el ADN vírico. El ADN vírico se limpió con un minikit DNeasy® (Qiagen; Valencia, CA) y se eluyó con 40 µl de agua. Se determinó el CG vírico usando una PCR cuantitativa. La disolución madre vírica se diluyó con disolución salina hasta el CG/ml deseable, y la disolución de trabajo (200 µl) se inyectó a los ratones a través de la vena de la cola.

Ensayo de glucosa en sangre.

Se recolectaron muestras de sangre de animales individuales que no estaban en ayunas por medio de un corte en la cola, y se midieron los niveles de glucosa en sangre usando un glucómetro (instrumentos Accu-Chek®; Roche Diagnostics, Indianápolis, Ind.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo del nivel de exposición en suero de FGF19 y variantes de FGF19.

Se recolectó sangre entera (aproximadamente 50 µl/ratón) de cortes en la cola y se introdujo en tubos capilares normales (BD Clay Adams SurePrep™, Becton Dickenson; Sparks, Md.). El suero y las células sanguíneas se separaron mediante centrifugación durante 10 min a 10.000 rpm, 4 °C en una centrífuga Autocrit™ Ultra 3 (Becton Dickinson) y se congelaron inmediatamente a -80 °C. Se midieron los niveles de FGF19 y variantes de FGF19 en suero usando un ELISA disponible en el mercado (Biovendor; Asheville, NC) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó FGF19 humano como patrón y se determinaron las concentraciones relativas de M70. Las concentraciones relativas de otros variantes de FGF19 pueden determinarse en consecuencia.

Mediciones de masa grasa y masa magra.

Se colocaron animales no anestesiados individualmente en un recipiente de plástico y se determinó la composición del cuerpo usando NMR-MRI (analizador de la composición del cuerpo entero, EchoMRI™, Houston, Tex.). Se registró la masa grasa, la masa magra y el contenido en agua (los datos no se presentan). El procedimiento completo no excedió de 2 minutos para cada animal.

Evaluación de los nódulos hepáticos patentes.

Veinticuatro semanas después de la inyección de AAV, los animales recibieron eutanasia y se examinaron los hígados individuales para la formación de nódulos patentes. Se contó y se registró el número de nódulos hepáticos visibles (>2 mm de diámetro).

Análisis estadístico.

5 Todos los resultados se expresan como promedio \pm error estándar del promedio (EEP). Se usó un ANOVA de una vía, seguido de un ensayo de Dunnett para comparar los datos de múltiples grupos (GraphPad Prism®; San Diego, CA). Cuando se indica, se empleó el ensayo de la t de Student desapareado para comparar dos tratamientos. Se usó un ANOVA de dos vías, seguido de un ensayo de Bonferroni para comparar múltiples grupos para los estudios de desarrollo en el tiempo. Un valor de 0,05 o menor se considera estadísticamente significativo.

10 Ejemplo 2: Niveles de FGF19 en plasma en ratones *db/db* tras el transporte de los genes

Se realizó un estudio de 24 semanas para evaluar si el variante de FGF19 M70 es capaz de bloquear la tumorigenicidad inducida por FGF19 en ratones *db/db*. Como alternativa a los métodos convencionales de transporte, se usó AAV en este ejemplo (y en los siguientes ejemplos 2-4) como vehículo para transportar y expresar genes exógenos de interés en ratones y permitir su exposición continua, persistente y sistémica a proteínas codificadas por los transgenes.

15 Antes del transporte de los genes, los ratones se clasificaron en seis grupos (5 ratones macho/grupo) como se indica en la tabla 1, y se registraron las mediciones de glucosa en sangre y peso corporal para cada ratón.

Tabla 1

Grupo	Construcción de AAV	Nivel de dosis (AAV)	Volumen (ml/ratón)	Descriptor
1	Disolución salina	0	0,2	Control
2	GFP	3e11	0,2	AAV-Control
3	FGF19-flag	3e9	0,2	FGF19 Dosis baja
4	FGF19-flag	3e10	0,2	FGF19 Dosis alta
5	M70 FGF19-flag	3e11 3e9	0,2 (total)	M70/FGF19 Dosis baja
6	M70 FGF19-flag	3e11 3e10	0,2 (total)	M70/FGF19 Dosis alta

20 En la semana 0, los ratones fueron inyectados con 0,2 ml de disolución salina o 0,2 ml de una de las construcciones de AAV procedentes de los grupos 2-6. En las semanas 3 y 5, de nuevo se registraron las mediciones de glucosa en sangre y peso corporal para cada ratón en los grupos 1-6.

25 Cinco semanas después del transporte de los genes, se midieron las concentraciones de FGF19 en suero aislado de los ratones inyectados con disolución salina (grupo 1) o construcciones de AAV (grupos 2-6). Puesto que el ELISA usado para medir las concentraciones de fármacos no fue capaz de distinguir de modo preciso entre FGF19 y M70, los niveles en plasma determinados para los grupos 5 y 6 representan las concentraciones en plasma totales de ambas proteínas.

30 Los resultados se indican en la figura 2. Los niveles de FGF19 detectados en ratones que recibieron dosis bajas (3e9; grupos 3) y altas (3e10; grupo 4) del virus FGF19-flag recombinante fueron proporcionales a la dosis de AAV ($1,4 \pm 0,5$ ng/ml y $93,6 \pm 12,6$ ng/ml, respectivamente). En ratones inyectados con ambos transgenes FGF19-flag y M70, el M70 del virus (3e11) estaba presente en un exceso de 100 o 10 veces, comparado con la construcción de FGF19-flag por sí sola. Como resultado de coinyectar los dos transgenes, se detectaron niveles en suero elevados de FGF19 en ambas dosis baja y alta de FGF19-flag ($734,0 \pm 61,1$ ng/ml (grupo 5) y $453,4 \pm 169,4$ ng/ml (grupo 6), respectivamente), que representan las contribuciones de la expresión de ambos M70 y FGF19-flag. Por contraste, el FGF19 fue indetectable en las muestras aisladas a partir de ratones *db/db* inyectados con disolución salina o AAV-GFP.

35 En la semana 23, de nuevo se registraron las mediciones de glucosa en sangre y peso corporal para cada ratón. Veinticuatro semanas después del transporte de los genes, todos los animales recibieron eutanasia y se sometieron a una necropsia.

Ejemplo 3: Formación mediada por FGF19 de nódulos hepáticos patentes en ratones *db/db* en ausencia y en presencia del variante de FGF19 M70

5 Usando los animales a los que se les había practicado una eutanasia del ejemplo 2, se estudiaron los hígados de los ratones individuales y se determinó el número de nódulos hepáticos visibles. Los resultados se indican en la figura 3. Las referencias a los números del grupo se remiten a la tabla 1.

10 Tal como se muestra en la figura 3, la expresión ectópica de FGF19-flag en el modelo de ratón *db/db* estimula la formación de múltiples nódulos de tumor grandes y alzados que sobresalen de la superficie del hígado, a las dosis víricas baja (3×10^9 ; grupo 3) y alta (3×10^{10} ; grupo 4) ($2,4 \pm 1,4$ lesiones por hígado y 7,8 lesiones por hígado, respectivamente). Por comparación, los hígados aislados de ratones que expresan ambos FGF19-flag y M70 estaban completamente exentos de nódulos hepáticos (grupo 5 y grupo 6). Los resultados se expresan como promedio y EEP para todos los animales dentro del mismo grupo de estudio. Debe advertirse que el componente de c-Flag no afectó a los efectos tumorigénicos de FGF19, aunque puede afectar a los efectos antidiabéticos de FGF19.

15 La expresión ectópica de FGF19-flag estimula la formación de nódulos hepáticos en ratones *db/db* a concentraciones en suero tan bajas como 1 ng/ml. Sin embargo, la tumorigénesis mediada por FGF19, tal como se pone de manifiesto por medio de la aparición de lesiones hepáticas, es completamente suprimida cuando se coexpresan los transgenes FGF19-flag y M70 en este modelo. Estos datos sugieren que no solo el variante de FGF19 modificado M70 carece del potencial tumorigénico en ratones asociado con la proteína de tipo salvaje, sino que también puede interferir de modo eficaz con los efectos proliferativos de la proteína de tipo salvaje.

20 Ejemplo 4: Efectos de la expresión de los transgenes en el peso y composición corporal en ratones *db/db*

25 Tal como se mencionó en el ejemplo 2, ratones *db/db* macho de 15 semanas ($n = 5$) fueron inyectados con 0,2 ml de disolución salina o transgenes de AAV recombinantes, tal como se indica en la tabla 1. Se midieron los pesos corporales para cada ratón antes de la inyección (semana -1) y 3, 5 y 23 semanas después de la inyección. Los resultados, indicados en la figura 4, se expresan como el promedio de mediciones individuales de todos los animales y EEP.

30 Los ratones *db/db* transgénicos que coexpresan M70 y FGF19-flag (grupos 5 y 6) mostraron reducciones significativas en el peso corporal comparado con animales dosificados con disolución salina (grupo 1). Se observaron unos efectos menos dramáticos en el peso corporal en los ratones que expresan el transgén FGF19-flag, aunque las reducciones parecen ser dependientes de la dosis y fueron significativas en las semanas 3 y 5 en animales inyectados con la dosis más alta (grupos 3 y 4).

35 Nótese que los ratones en ambos grupos control (dosificados con disolución salina (grupo 1) o AAV-GFP (grupo 2)), tendieron a mostrar una pérdida de masa significativa al final del estudio, comparado con sus pesos corporales máximos en las semanas 3 y 5 tras el transporte de los genes. La pérdida de peso corporal en estos animales se asocia habitualmente con la grave hiperglucemia observada en ratones *db/db* y el avance de la diabetes de tipo 2 durante el desarrollo del estudio de 24 semanas.

40 Los cambios en el peso corporal observados en ratones que coexpresan los transgenes FGF19-flag y M70 se reflejan en unos pesos reducidos del hígado, comparado con los hígados recolectados de animales en el grupo de disolución salina (los datos no se muestran); de modo notable, el tamaño reducido del órgano fue directamente proporcional al menor peso corporal en estos ratones. Por contraste, el peso relativo del hígado aumentó en los ratones que expresan FGF19-flag, aunque, de modo similar, estos cambios no fueron significativos cuando se normalizan al peso corporal (los datos no se muestran)

45 Además, se determinaron los efectos del tratamiento sobre la composición corporal 23 semanas después de la inyección usando NMR-MRI. En coherencia con las reducciones observadas en el peso corporal, la coexpresión ectópica de los transgenes M70 y FGF19-flag produjo una pérdida de masa grasa y masa magra en ratones *db/db*, comparado con los ratones tratados con disolución salina (los datos no se muestran). La expresión de FGF19-flag tuvo poco efecto sobre la composición corporal en ratones *db/db* que habían recibido la dosis baja o alta del transgén (los datos no se muestran).

Ejemplo 5: Efectos de la expresión de los transgenes en la glucosa en sangre sin ayunar en ratones *db/db*

50 Tal como se mencionó en el ejemplo 2, ratones *db/db* macho de 15 semanas ($n = 5$) fueron inyectados con 0,2 ml de disolución salina o transgenes de AAV recombinantes, tal como se indica en la tabla 1. Se midió la glucosa en sangre para cada ratón antes de la inyección (semana -1) y 3, 5 y 23 semanas después de la inyección. Los resultados, indicados en la figura 5, se expresan como el promedio de mediciones individuales de todos los animales y EEP.

55 Los ratones *db/db* transgénicos que coexpresan M70 y FGF19-flag (grupos 5 y 6) mostraron reducciones significativas en las concentraciones de glucosa en sangre comparado con los animales control (grupos 1 y 2). Los niveles de glucosa se redujeron con rapidez en ratones que coexpresan los transgenes FGF19-flag y M70,

alcanzando unos niveles de meseta aproximadamente 3 semanas después del transporte de los genes (160 y 141 mg/dl a la dosis alta (grupo 6) y dosis baja (grupo 5) del transgén FGF19-flag, respectivamente). Los niveles de glucosa en sangre en ratones que expresan FGF19-flag (grupos 3 y 4) fueron significativamente menores que en los grupos control, y se mantuvieron en los niveles de la línea de base inicial (aproximadamente 400-450 mg/dl) durante el desarrollo del estudio de 24 semanas. Tal como se indicó previamente, aunque el componente c-Flag no afectó a los efectos tumorigénicos de FGF19, puede afectar a los efectos antidiabéticos de FGF19. Los bajos niveles sistémicos de FGF19-flag detectados en estos ratones parecen proporcionar algo de protección frente a la glucemia deteriorante observada en los ratones tratados con disolución salina o AAV-GFP, pero no pueden disminuir los niveles de glucosa por debajo de los valores de la línea de base.

Tal como se esperaba, no se observó disminución de la glucosa durante el desarrollo del estudio después de la inyección de disolución salina (grupo 1) o un virus control, AAV-GFP (grupo 2). Nótese que las concentraciones de glucosa en sangre determinadas por el glucómetro en los grupos control (aproximadamente 600 mg/dl) representan el límite superior de detección del instrumento y pueden infrarepresentar la concentración real de glucosa en estas muestras.

Ejemplo 6: Materiales y métodos para los ejemplos 7-11

Se emplearon los siguientes métodos y materiales en los siguientes ejemplos 7-16.

Construcciones de ADN.

Los ADNc de FGF19 humano (NM_005117), FGFR4 humano (NM_022963), FGFR4 de ratón (NM_008011), KLB humano (NM_175737) y KLB de ratón (NM_031180) se adquirieron en Genecopoeia. Se introdujeron mutaciones en las construcciones de FGF19 usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange™ (Stratagene).

Producción y purificación de AAV que codifican FGF19 y variantes de FGF19.

Se cultivaron células AAV293 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) en la modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM, Mediatech, Herndon, VA) suplementada con suero bovino fetal al 10% y 1× disolución de antibiótico-antimicótico (Mediatech). Las células se cultivaron a una densidad del 50% en el día 1 en placas de cultivo celular de 150 mm y se transfectaron en el día 2, usando el método de precipitación con fosfato de calcio, con los siguientes tres plásmidos (20 µg/placa de cada uno): i) plásmido de transgenes de AAV, ii) plásmidos pHelper (Agilent Technologies), y iii) plásmido de AAV2/9 (Rabinowitz *et al.*, 2002). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se rasparon de las placas, se sedimentaron mediante centrifugación a 3000×g y se resuspendieron en un tampón que contenía Tris 20 mM, pH 8,5, NaCl 100 mM y MgCl₂ 1 mM. La suspensión se congeló en un baño de hielo seco y alcohol y después se descongeló en un baño de agua de 37 °C; el ciclo de congelación-descongelación se repitió tres veces. Se añadió Benzonase® (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) hasta 50 unidades/ml y se añadió desoxicolato hasta una concentración final del 0,25%. Después de una incubación a 37 °C durante 30 minutos, los residuos celulares se sedimentaron mediante centrifugación a 5000×g durante 20 minutos. Las partículas víricas en el sobrenadante se purificaron usando un gradiente de iodixanal discontinuo (Sigma-Aldrich) como ha sido descrito previamente (Zolotukhin *et al.* (2002), *Endocrinology*, 143(5):1741-1747). La disolución madre vírica se concentró usando Vivaspin® 20 (límite de exclusión de peso molecular (PM) de 100.000 Da, Sartorius Stedim Biotech; Aubagne, Francia) y se resuspendió en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) con glicerol al 10% y se conservó a -80 °C.

Para determinar el número de copias del genoma (CG) vírico, se incubaron 2 µl de la disolución madre vírica en 6 µl de una disolución que contenía 50 unidades/ml de benzonasa, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, y CaCl₂ 10 mM a 37 °C durante 30 minutos. Después se añadieron 15 µl de una disolución que contenía 2 mg/ml de proteinasa K, SDS al 0,5%, y EDTA 25 mM, y la mezcla se incubó durante 20 minutos más a 55 °C para liberar el ADN vírico. El ADN vírico se limpió con un minikit DNeasy® (Qiagen; Valencia, CA) y se eluyó con 40 µl de agua. Se determinó el CG vírico usando una PCR cuantitativa. La disolución madre vírica se diluyó con disolución salina hasta el CG/ml deseable, y la disolución de trabajo (200 µl) se inyectó a los ratones a través de la vena de la cola.

Experimento con animales.

Todos los estudios con animales fueron aprobados por the NGM Institutional Animal Care and Use Committee. Los animales se alojaron en unas instalaciones para animales sin patógenos a 22 °C bajo un ciclo controlado de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Todos los ratones se mantuvieron con un pienso convencional (Harlan Laboratories, Teklad 2918) y con agua tratada en autoclave sin limitaciones. Los ratones eran machos, a menos que se indique lo contrario. Los ratones C57BL/6J, FVB/NJ, BDF, *ob/ob*, y *db/db* se adquirieron en Jackson Laboratory. Los ratones transgénicos *rash2* heterocigóticos se obtuvieron en Taconic. En el día -7, cohortes de ratones de 10-12 semanas *ob/ob* o *db/db*, o ratones de 6-8 semanas C57BL/6J, FVB/NJ, BDF o *rash2* fueron aleatorizados en grupos de tratamiento basándose en el peso corporal. Todos los animales recibieron una única inyección intravenosa de 200 µl de 3×10¹¹ copias del genoma de AAV a través de la vena de la cola en el día 1. Se registraron los pesos corporales y se recolectó sangre a través de un corte en la cola para medir los niveles de FGF19 en suero. Los animales recibieron eutanasia y se recolectaron los hígados 24 o 52 semanas después de la dosificación con

AAV.

Análisis generales, histológicos e inmunohistoquímicos.

Para determinar la aparición de cambios en el hígado en ratones inyectados con AAV-FGF19 se realizaron evaluaciones generales e histológicas en intervalos designados en el transcurso de un año. Tras la necropsia se registraron el peso corporal, el peso del hígado, y el número de nódulos tumorales hepáticos. Para el cálculo de la puntuación de tumor para los variantes de FGF19, puntuación de tumor = número de nódulos tumorales sobre la superficie completa del hígado que expresa el variante/número de nódulos tumorales sobre la superficie completa del hígado que expresa el FGF19 de tipo salvaje. Por tanto, los ratones que expresan FGF19 recibieron una puntuación tumoral con un valor arbitrario de 1. Secciones de tejido fijadas en formol e introducidas en parafina se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) para la evaluación histológica de hiperplasia, hipertrofia o neoplasia hepatocítica. Cuando se indica, las secciones de hígado se trataron para la retirada del antígeno usando tampón citrato (Vector Laboratories) y después se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpos anti-PCNA (Dako), anti-Ki67 (Dako), anti-glutamina sintetasa (ThermoFisher), o anti-β-catenina (Cell Signaling). Se usó un anticuerpo secundario biotinilado, reactivo ABC-HRP, y sustrato de peroxidasa colorimétrico DAB (Vector Laboratories) para la detección. Para la tinción de LacZ, los hígados se introdujeron en OCT y se cortaron en un criostato. Se fijaron secciones de tejidos en PBS que contenía paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% durante 10 minutos y se incubaron con 1 mg/ml de X-gal (Promega) en ferrocianuro de potasio 5 mM y ferricianuro de potasio 5 mM a 37 °C durante 2 horas.

Ensayos de luciferasa.

Se obtuvieron mioblastos L6 de rata de American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron en modificación de Dulbecco del medio de Eagle ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", DMEM) suplementado con suero bovino fetal ("fetal bovine serum", FBS) al 10% a 37 °C bajo 5% de CO₂. Se transfectaron de modo transitorio células en placas de 96 pocillos con vectores de expresión que codifican KLB de ratón, FGFR4 de ratón, activador transcripcional GAL4-Elk-1 (pFA2-Elk1, Stratagene), sitios de unión de GAL4 dirigidos por un indicador de luciferasa de luciérnaga (pFR-luc, Stratagene), y luciferasa de *Renilla* (pRL-SV40, Promega), usando el reactivo de transfección FuGENE® 6 (Roche Applied Science). El día después de la transfección, las células se estimularon durante 6 horas con ligandos en medio sin suero que contenía heparina 20 µg/ml (Sigma). Las células se lisaron con tampón de lisis (Promega) y se determinó la actividad luciferasa usando un sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo® (Promega) y un lector de placas EnSpire® (Perkin Elmer). La actividad luciferasa de luciérnaga se normalizó a la actividad luciferasa de *Renilla* coexpresada, y se muestra como promedio ± EEP de tres replicaciones.

Expresión de Cyp7a1 en hepatocitos primarios.

Se cultivaron hepatocitos primarios procedentes de hígados de ratón, rata o humano (Life Technologies) sobre placas de 96 pocillos revestidas con colágeno I (Becton Dickinson) y se incubaron durante la noche en medio E de Williams suplementado con dexametasona 100 nM y matrigel 0,25 mg/ml. Las células se trataron con proteínas de FGF19 o M70 recombinantes durante 24 horas (hepatocitos de ratón o rata) o 6 horas (hepatocitos humanos). Se determinó la expresión de Cyp7a1 en los lisados celulares mediante análisis qRT-PCR usando la mezcla maestra de qRT-PCR múltiplex QuantiTect (Qiagen) y cebadores y sondas preparados previamente (Life Technologies; Cyp7a1 de ratón: Mm00484150_m1; Cyp7a1 de rata: Rn00564065_m1; Cyp7a1 humano: Hs00167982_m1). Las reacciones se realizaron por triplicado en un sistema de detección de secuencias Applied Biosystems 7900HT. Se calcularon los niveles relativos de ARNm mediante el método del ciclo umbral comparativo usando ARN 18S (ratón y rata) o actina (humana) como patrón interno.

Análisis de señalización *in vivo*.

Ratones *db/db* (9-11 semanas de edad) (Jackson Laboratories) recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) (1 mg/kg) de las proteínas recombinantes de FGF19 o M70. Los hígados se recolectaron 15 minutos, 2 horas o 4 horas después de la inyección y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras de hígado congeladas se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP40 al 1% y ácido desoxicólico sodio al 0,5%, ditiotretol 1 mM, PMSF 1 mM, fluoruro de sodio 2 mM, y ortovanadato de sodio 2 mM) que contenía inhibidores de proteasas (Roche) e inhibidores de fosfatasa (Sigma). Se separaron cantidades iguales de proteína (15 µg), según se determina mediante un ensayo de BCA (Thermo Fisher) en geles de poliacrilamida al 4-20% (Bio-Rad) y se trasladaron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon en leche desnatada en polvo al 5% en PBS/Tween 20 al 0,05% y se incubaron con anticuerpos contra pSTAT3 (Cell Signaling), STAT3 (Cell Signaling), o cóctel de anticuerpos I (Cell Signaling). Los anticuerpos unidos se detectaron con reactivos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano ("horse radish peroxidase", HRP) y se visualizaron usando un escáner Odyssey® (Li-Cor Biotechnology).

Experimentos de xenoinjerto.

Ratones hembra *nu/nu* atímicos de 6-8 semanas (Charles River Laboratories) fueron inyectados por vía subcutánea en los flancos con 5×10⁶ células (200 µl/ratón). Los ratones que portan tumores de volúmenes similares

(aproximadamente 100 mm³) se aleatorizaron en grupos y se trataron mediante una sola inyección en la vena de cola de 3×10^{11} AAV-M70 o un virus control (AAV-GFP). Los tumores se midieron con un calibrador electrónico y se calculó el volumen tumoral promedio usando la fórmula: $(W^2 \times L)/2$, en la que W y L son el diámetro más corto y más largo, respectivamente.

5 Análisis estadístico.

Todos los resultados se expresan como promedio \pm error estándar del promedio (EEP). Se usó un ANOVA de una vía, seguido de un ensayo de Dunnett para comparar los datos de múltiples grupos (GraphPad Prism®). Cuando se indica, se empleó el ensayo de la t de Student desapareado para comparar dos grupos de tratamiento. Se usó un ANOVA de dos vías, seguido de un ensayo de Bonferroni para comparar múltiples grupos para los estudios de desarrollo en el tiempo. Un valor de 0,05 o menor se considera estadísticamente significativo.

Ejemplo 7: Sistema de transgenes mediado por AAV para la evaluación de la tumorigénesis hepatocelular *in vivo*

El transporte de genes mediado por AAV proporciona un medio para lograr una expresión continua de transgenes sin las respuestas inflamatorias asociadas habitualmente con otros vectores víricos (Zaiss *et al.*, 2002, J. Virol., 76, 4580-4590). Se ha observado una expresión sostenida de hasta 1 año con el método de transporte de genes de AAV cuando se introduce en ratones adultos (Rivera *et al.*, 1999, PNAS, 96, 8657-8662). El primer vector de AAV ha sido recientemente aprobado como tratamiento de un trastorno genético en el ser humano (Wirth *et al.*, 2013, Gene, 525, 162-169).

En el modelo transgénico de FGF19 previamente indicado, el FGF19 fue expresado ectópicamente en el músculo esquelético, un sitio no fisiológico de expresión de FGF19 (Inagaki *et al.*, 2005, Cell Metabol., 2, 217-225; Nicholes *et al.*, 2002, Amer. J. Pathol., 160, 2295-2307). Bajo condiciones patológicas, tales como cirrosis o colestasis, la expresión de FGF19 es inducida en el hígado (Desnoyers *et al.*, 2008, Oncogene, 27, 85-97; Hasegawa Y., 2013, Hepatol., 58, 802A; Schaap *et al.*, 2009, Hepatol., 49, 1228-1235). Como alternativa a los métodos convencionales para generar ratones transgénicos, el FGF19 fue introducido mediante AAV en ratones de 6-12 semanas de edad (figura 6A). Con esta estrategia, el principal tejido de la expresión transgénica es el hígado, con solo una expresión marginal en el corazón y el músculo (los datos no se muestran). Se observó una transducción del 90-100% de los hepatocitos y una expresión génica a largo plazo sin toxicidad tras una única administración de AAV, tal como se ha indicado previamente (Zincarelli *et al.*, 2008, Mol. Ther.m 16, 1073-1080) (los datos no se muestran).

Se evaluaron múltiples razas de ratones para la latencia y la robustez de la formación de tumores hepáticos mediada por FGF19 (tabla 2). Un virus AAV control (AAV-GFP, proteína fluorescente verde) no produjo tumores hepáticos (tabla 2).

Tal como se muestra en la tabla 2, el FGF19 estimula la hepatocarcinogénesis en múltiples modelos de ratón. Diversas razas de ratones (6-12 semanas de edad) fueron inyectadas con 3×10^{11} copias del genoma de vectores de AAV que codifican FGF19 o un gen control (GFP, "green fluorescent protein", proteína fluorescente verde). Se determinó la incidencia de los tumores a las 24 o 52 semanas después de la administración de AAV. n.d., no determinado.

Tabla 2

Raza de ratón	FGF19		Control	
	24 semanas	52 semanas	24 semanas	52 semanas
C57BL6/J	0/5	4/5 (80%)	0/5	0/5
BDF	0/5	5/5 (100%)	0/5	0/5
FVB/N	0/5	3/5 (60%)	0/5	0/5
<i>ob/ob</i>	3/5 (60%)	n.d.	n.d.	n.d.
<i>db/db</i>	5/5 (100%)	n.d.	n.d.	n.d.

En general, los ratones inyectados con AAV-GFP mostraron un fenotipo similar a los animales inyectados con disolución salina (los datos no se muestran). Para simplificar, solo se muestran los resultados procedentes de animales inyectados con AAV-GFP como control en los siguientes estudios.

De manera interesante, la latencia tumoral varía dependiendo del trasfondo genético del ratón. Con frecuencia se encuentran mutaciones en el receptor de leptina en hígados cirróticos y están relacionadas con el HCC en seres humanos (Ikeda *et al.*, 2014, Gastroenterol., 146:222-232; Wang *et al.*, 2010, World J. Gastroenterol., 16, 5801-5809). Los ratones *db/db*, que tienen un defecto genético en el receptor de leptina (Tartaglia *et al.*, 1995, Cell, 83,

1263-1271), proporcionan un contexto genético clínicamente pertinente para evaluar genes candidatos a estimulantes de HCC. En efecto, de entre varias razas de ratones ensayadas, los ratones *db/db* muestran la latencia más corta y la mayor penetración del tumor, con la aparición de múltiples nódulos tumorales grandes y alzados que sobresalen de la superficie del hígado 24 semanas después del transporte de AAV-FGF19 (figura 6B).

5 Los niveles de FGF19 en suero alcanzaron aproximadamente 1 µg/ml, 1 semana después de una única inyección en la vena de la cola de 3×10^{11} copias del genoma de AAV-FGF19 en ratones *db/db* (figura 6C). No se detectó FGF19 en ratones inyectados con virus control. Los altos niveles de FGF19 en la circulación persistieron a lo largo del periodo de estudio de 24 semanas (figura 6C). Se contaron nódulos tumorales visibles sobre toda la superficie del hígado (figura 6D). Se registró el diámetro máximo de los nódulos tumorales del hígado (figura 6D). A veces se observaron unos pocos nódulos tumorales en ratones *db/db* inyectados con virus control o disolución salina, lo cual probablemente refleja un mayor trasfondo en la tumorigénesis en este modelo genético (figura 6D, los datos no se muestran). Se estableció un sistema de puntuación del tumor basándose en la multiplicidad de los nódulos tumorales hepáticos como se describe en la sección de materiales y métodos (ejemplo 6) (figura 6D).

15 El examen microscópico clasifica los tumores de hígado inducidos por AAV-FGF19 *in situ* como HCC sólidos, que se parecen los indicados en animales transgénicos para FGF19 (figura 6E). El estado proliferativo celular, estudiado mediante tinción inmunohistoquímica para Ki-67 y PCNA, indica que los tumores eran muy proliferativos. De modo similar a lo observado en ratones transgénicos para FGF19, los tumores hepáticos en ratones AAV-FGF19 eran positivos a glutamina sintetasa, lo cual sugiere un origen pericentral (Nicholes *et al.*, 2002, Amer. J. Pathol., 160, 2295-2307) (figura 6E). Los tumores hepáticos de los ratones AAV-FGF19 también mostraron mayor tinción nuclear para la β-catenina (figura 6E). Así, la expresión de transgenes mediada por AAV proporciona un sistema robusto para evaluar la hepatocarcinogénesis inducida por FGF19 *in vivo*.

Ejemplo 8: El M70 es un variante de FGF19 modificado que no provoca tumores

25 FGF19 y FGF21 pertenecen a la misma subfamilia de FGF y comparten 34% de identidad de aminoácidos. De modo interesante, a diferencia de FGF19, FGF21 no induce la formación de tumores hepáticos en los modelos de transgenes mediados por AAV de los inventores (los datos no se muestran). Para identificar elementos estructurales que son fundamentales para la tumorigenicidad inducida por FGF19, se generó una serie de construcciones quiméricas entre FGF19 y FGF21 intercambiando sistemáticamente elementos de la estructura secundaria predichos, que incluyen hebras-α y β-hélices (tabla 3). La tabla 3 muestra construcciones quiméricas con secuencias de aminoácidos derivadas de FGF19 o FGF21. La formación de tumores hepáticos se evaluó 24 semanas después de la expresión de transgenes mediada por AAV. Los componentes de la estructura secundaria (láminas β y bucles entre láminas β) de FGF19 fueron reemplazados sistemáticamente. Las construcciones se introdujeron individualmente en ratones *db/db* mediante AAV para evaluar su potencial tumorigénico después de 24 semanas de exposición continua. Los 10-20 aminoácidos N-terminales de FGF19 se identificaron como cruciales para la tumorigenicidad (tabla 3).

35

Tabla 3

Nombre	Aminoácidos de FGF19	Aminoácidos de FGF21	Puntuación tumoral
Control			0,00 ± 0,00
FGF19	R23-K216		1,00 ± 0,18
FGF21		H28-S208	0,00 ± 0,00
Variantes de "extremo intercambiado" de FGF19:			
N-ter	R23-R43	H28-R44	0,00 ± 0,00
C-ter	P170-K216	R162-S208	2,70 + 0,50
Variantes de "bucle intercambiado" de FGF19:			
Bucle-1	S50-L56	D51-T56	0,59 + 0,29
Bucle-2	R63-G66	R63-G66	2,55 + 0,34
Bucle-3	A71-A76	A71-P76	1,58 + 0,51
Bucle-4	A86-T89	K86-V89	1,69 + 0,27
Bucle-5	G94-S97	G94-T97	0,90 + 0,17
Bucle-6	A105-G107	P105-G107	1,00 + 0,17

ES 2 753 264 T3

Bucle-7	L112-S116	S112-D129	0,67 + 0,18
Bucle-8	R127-D129	L127-D129	0,06 + 0,03
Bucle-9	S136-H139	S136-H139	0,79 + 0,10
Bucle-10	V143-L162	L143-K149	1,32 + 0,22
Bucle-11	R157-H164	R158-G168	1,24 + 0,38
Variantes de "lámina intercambiada" de FGF19:			
Lámina-1	R43-T49	R44-T50	0,32 + 0,14
Lámina-2	S57-I62	E57-I62	0,35 + 0,10
Lámina-3	V67-A71	T67-A71	1,78 + 0,14
Lámina-4	L80-V85	L80-L85	3,99 + 0,63
Lámina-5	T89-K93	V89-L93	0,38 + 0,05
Lámina-6	V98-G104	S98-R104	0,73 + 0,17
Lámina-7	K108-G111	A108-G111	1,91 + 0,66
Lámina-8	F122-R127	F122-L127	0,94 + 0,21
Lámina-9	G130-S136	G130-S136	1,17 + 0,22
Lámina-10	R140-P142	G140-P142	2,00 + 0,41
Lámina-11	F165-M168	R158-A161	0,38 + 0,31

Posteriormente se generaron otras construcciones alterando solo aminoácidos dentro de esta región (tabla 4). La tabla 4 muestra el análisis de relación entre estructura y actividad de variantes de FGF19 en la región N-terminal. Los cambios de aminoácidos con respecto al FGF19 de tipo salvaje están subrayados. La formación de tumores hepáticos se evaluó 24 semanas después de la expresión de los transgenes.

5

Tabla 4

Nombre	Secuencia N-terminal	Puntuación tumoral
Control		0,00 ± 0,00
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,00 ± 0,18
Variantes de SAR N-terminal de FGF19:		
N1	R-----DAGPHVHYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,25 ± 0,30
N2	R-----VHYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	0,00 ± 0,00
SSL	R-----D <u>S</u> S <u>P</u> L <u>V</u> HYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	0,00 ± 0,00
SSH	R-----D <u>S</u> S <u>P</u> HVHYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	2,39 ± 0,93
SGL	R-----D <u>S</u> G <u>P</u> L <u>V</u> HYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	0,68 ± 0,14
ASL	R-----D <u>A</u> S <u>P</u> L <u>V</u> HYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,09 ± 0,18
EDL	R-----D <u>E</u> D <u>P</u> L <u>V</u> HYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,18 ± 0,45
EGL	R-----D <u>E</u> G <u>P</u> L <u>V</u> HYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,15 ± 0,17
EDH	R-----D <u>E</u> D <u>P</u> HVHYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,00 ± 0,36

EGH	R-----D <u>E</u> GPHVHYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,44 ± 0,05
QGH	R-----D <u>Q</u> GPHVHYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,01 ± 0,16
QGL	R-----D <u>Q</u> G <u>P</u> L <u>V</u> HYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	0,68 ± 0,12
QSH	R-----D <u>Q</u> S <u>P</u> HVHYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,42 ± 0,20
ESH	R-----D <u>E</u> S <u>P</u> HVHYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,22 ± 0,31
QSL	R-----D <u>Q</u> S <u>P</u> L <u>V</u> HYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	1,08 ± 0,33
ESL	R-----D <u>E</u> S <u>P</u> L <u>V</u> HYGWGDP I R L RHLYTSGPHGLSS	0,01 ± 0,01

En total, se ensayaron individualmente más de 30 variantes de FGF19 para su tumorigenicidad. Se seleccionó un variante de FGF19 que porta 3 sustituciones de aminoácidos (A30S, G31 S, H33L) y una delección de 5 aminoácidos, denominado M70 (SEQ ID NO:1), para posteriores estudios (figura 7A).

- 5 Por contraste con FGF19, los hígados de ratones *db/db* con alta exposición sistémica a M70 durante 24 semanas estaban completamente exentos de nódulos de tumores hepáticos (15,6 ± 2,8 nódulos tumorales por hígado y 0,0 ± 0,0 nódulos tumorales por hígado para FGF19 y M70, respectivamente, n = 5, p<0,001; figura 7B). Los ratones que expresan FGF19 mostraron un aumento significativo en el peso del hígado (2,91 ± 0,19 g frente a 1,86 ± 0,12 g en ratones control, n = 5, p<0,001; figura 7C), lo cual, tal como se indicó en estudios previos, se correlaciona en gran medida con la carga tumoral hepática. Por contraste, los ratones que expresan M70 no mostraron un aumento en el peso del hígado (1,56 ± 0,09 g frente a 2,91 ± 0,19 g en ratones FGF19, n = 5, p<0,001; figura 7C). Se obtuvieron resultados similares cuando se calculó la proporción de peso del hígado frente al peso corporal (figura 7D y figura 7E). La concentración promedio en suero de M70 fue de 2-3 µg/ml en estos ratones, aproximadamente 10.000 veces mayor que el nivel de FGF19 en la circulación en seres humanos (figura 7F). El análisis histológico del hígado reveló que los ratones que expresan M70 no desarrollan ninguna lesión preneoplásica y neoplásica discernible asociada con la sobreexpresión de FGF19 en ratones. De modo específico, no se observaron focos hepáticos alterados, displasia hepatocelular, adenomas hepatocelulares, o carcinomas hepatocelulares (figura 7G). En ratones que expresan FGF19, las regiones no tumorigénicas muestran una mayor densidad celular alrededor de la vena central, pero no se observa este cambio en ratones que expresan M70. La sobreexpresión de M70 no provocó la aparición de un número mayor de células positivas a Ki-67 que surgen de la sobreexpresión de FGF19 (figura 7G). Además, mientras que las lesiones tumorales hepáticas en células que expresan FGF19 si hicieron muy positivas a la glutamina sintetasa, no se observó un aumento en la expresión de glutamina sintetasa en el hígado de ratones que expresan M70 (figura 7G). Por último, no se observó toxicidad hepática después de 24 semanas de exposición prolongada a M70, según se determina mediante los niveles en suero de enzimas hepáticas (figura 7H). Tomados conjuntamente, estos resultados demuestran que M70 carece de la capacidad para estimular la tumorigénesis hepatocelular en ratones *db/db*.

- También se evaluó la tumorigenicidad de M70 en un modelo de ratón transgénico *rasH2*. Los ratones hemicigóticos CB6F1-*RasH2* para el transgén H-RAS humano se han utilizado mucho como evaluación acelerada de la valoración de la carcinogenicidad de 2 años convencional en roedores (Storer *et al.*, 2010, Toxicologic Pathol., 38, 51-61). Sensibles a carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos, los ratones *rasH2* desarrollan neoplasmas espontáneos e inducidos antes que los ratones de tipo salvaje. Esta raza también proporciona un trasfondo genético pertinente para estudiar la hepatocarcinogenicidad, puesto que con frecuencia se observa la activación de la vía de señalización de RAS en el HCC humano (Calvisi *et al.*, 2006, Gastroenterol., 130, 1117-1128).

- 35 Durante el desarrollo del estudio de 52 semanas, los ratones *rasH2* que expresan FGF19 o M70 presentan una significativa reducción de la ganancia de peso corporal, comparado con ratones control (figura 8A). Sin embargo, la morfología de los hígados procedentes de grupos que expresan FGF19 y M70 mostró notables diferencias. Se observaron cambios morfológicos patentes con múltiples nódulos tumorales en los hígados de ratones que expresan FGF19, lo cual es coherente con la formación de HCC (3,8 + 1,5 nódulos tumorales por hígado; figura 8B). Por contraste, los hígados procedentes de ratones que expresan M70 tienen una morfología general normal y estaban completamente exentos de nódulos tumorales (figura 8B). Debe advertirse que se observó un nivel bajo de formación de tumores hepáticos espontáneos en ratones *rasH2* control (figura 8B). Los animales que expresan M70 muestran una disminución notable en el peso del hígado, comparado con ratones FGF19 (0,76 + 0,05 g frente a 1,71 + 0,24 g en ratones FGF19, n = 9, p<0,001; figura 8C). M70 también normalizó la proporción de peso del hígado a peso corporal en ratones *rasH2* (5,34 + 0,24% frente a 8,66 + 1,36% en ratones FGF19, n = 9, p<0,01; figura 8D). Los niveles en suero de FGF19 y M70 en estos ratones son comparables, y son 155 ± 28 ng/ml y 209 ± 22 ng/ml, respectivamente (figura 8E).

Se evaluaron secciones de hígado teñidas con H & E procedentes de estos ratones para la presencia de tumores y lesiones preneoplásicas (figura 8F). Además, se realizó una tinción anti-glutamina sintetasa como marcador de

tumores hepáticos inducidos por FGF19 (figura 8F). Las secciones teñidas para la glutamina sintetasa se tomaron de un área apareada teñida con H & E, y las fotografías muestran las mismas venas porta (p) y central (c). Los ratones rasH2 que expresan FGF19 muestran adenoma hepatocelular, así como carcinomas hepatocelulares. También se advirtieron lesiones hepatocelulares preneoplásicas en ratones rasH2 que expresan FGF19. De modo notable, ninguno de los hígados procedentes de ratones que expresan M70 muestra tumores ni pruebas histológicas de lesiones preneoplásicas (figura 8F). Corroborando los resultados histológicos, se observó un aumento en la expresión hepática de Ki-67 y AFP (una proteína hepática embrionaria a menudo inducida en HCC (Marrero y El-Serag, 2011, *Hepatology*, 53, 1060-1062) en ratones rasH2 que expresan FGF19, pero no en ratones que expresan M70 (figura 8G).

Estos resultados demuestran que, a diferencia de FGF19, la exposición prolongada a altos niveles en la circulación de M70 (concretamente, 24 semanas en ratones *db/db* o 52 semanas en ratones rasH2) no estimula la formación de tumores hepáticos.

Ejemplo 9: El M70 se une y activa FGFR4 *in vitro* e *in vivo*

Para aclarar el mecanismo molecular que subyace a la incapacidad de M70 para inducir tumores hepáticos, se evaluó la interacción de M70 con el complejo de receptor conocido de FGF19. Se usó un análisis de resonancia de plasmón de superficie ("surface plasmon resonance", SPR) para medir la unión directa de M70 o FGF19 a FGFR4. En un ensayo Biacore, se usó M70 o FGF19 para que fluyese sobre chips revestidos con una proteína de fusión de Fc del dominio extracelular ("extracellular domain", ECD) de FGFR4. El M70 interacciona directamente con FGFR4 con una afinidad comparable con FGF19 (constante de disociación $K_D = 134 \pm 47$ nM y 167 ± 5 nM, respectivamente, figura 9A y figura 9B). El M70 también se une con una afinidad a KLB similar a FGF19 ($K_D = 24,1 \pm 11,0$ pM y $28,5 \pm 0,8$ pM, respectivamente; los datos no se muestran). El M70 se une al mismo sitio de KLB que FGF19, lo cual se demuestra mediante un ensayo de competición de Biacore (los datos no se muestran). En un ensayo en fase sólida, M70 interacciona con el complejo de receptor FGFR4-KLB (figura 9C). La presencia de KLB aumento mucho la afinidad de ligando-receptor. La constante de disociación de la unión de M70 al complejo de receptor FGFR4-KLB indica una interacción de alta afinidad, con una K_D de 2,14 nM (frente a una K_D de 2,49 nM para FGF19).

La capacidad de M70 de activar sus receptores se evaluó en un ensayo basado en células usando células L6 de rata transfectadas con un gen indicador de luciferasa GAL-Elk1 que responde a FGF (Wu *et al.*, 2011, *PLoS one* 6, e17868; Wu *et al.*, 2010a, *PNAS*, 107, 14158-14163). En este ensayo, una unión eficaz de un ligando a FGFR provoca la activación de la vía de ERK quinasa endógena, que conduce a la posterior activación de un activador transcripcional quimérico que comprende un dominio de activación de Elk-1 y un dominio de unión a ADN GAL4. Las células L6 carecen de FGFR o KLB funcionales y solo responden a FGF19 cuando se cotransfectan con receptores cognados (los datos no se muestran). El M70 activa vías de señalización intracelulares en células L6 que coexpresan FGFR4 y KLB de una manera tan eficaz como FGF19 ($EC_{50} = 38$ pM y 52 pM para M70 y FGF19, respectivamente; figura 9D). Por contraste, la señalización en células transfectadas solo con FGFR4 responde mucho menos a cualquiera de los ligandos, y muestra una reducción en >500 veces en la potencia tras la adición de FGF19 o de M70 (figura 9D). Estos resultados sugieren que la formación de un complejo ternario entre los correceptores FGFR4-KLB y los ligandos cognados es importante para la activación potente de la señalización intracelular. Después se analizó la activación de la vía de FGFR4 en Hep3B, una línea de células HCC humana. Las células Hep3B expresan predominantemente FGFR4, entre las isoformas de FGFR, y KLB. La proteína de M70 recombinante induce la fosforilación y la activación de ERK con una potencia y eficacia similares a las de FGF19 de tipo salvaje (concentración eficaz semimáxima $CE_{50} = 0,38$ nM y 0,37 nM para M70 y FGF19, respectivamente; figura 9E).

Se han implicado a FGF19/FGF15 en la regulación del metabolismo del ácido biliar hepático en seres humanos y en roedores, respectivamente (Holt *et al.*, 2003, *Genes Dev.*, 17, 1581-1591; Inagaki *et al.*, 2005, *Cell Metabol.*, 2, 217-225). FGF19/FGF15 reprimen fuertemente la expresión hepática de la colesterol-7 α -hidroxilasa 1 (Cyp7a1), en un proceso que requiere de FGFR4 (Inagaki *et al.*, 2005, *Cell Metabol.*, 2, 217-225; Wu *et al.*, 2011, *PLoS one* 6, e17868). Se evaluó la capacidad de M70 para regular a Cyp7a1 en hepatocitos primarios. Tras su adición al medio de cultivo, M70 reprimió con eficacia la expresión de Cyp7a1 en hepatocitos primarios derivados de hígado de ratón, rata o humano (figura 9F). La actividad de M70 es comparable a la de FGF19 de tipo salvaje (concentración inhibidora semimáxima IC_{50} 0,64 pM para M70 frente a 0,65 pM para FGF19 en hepatocitos de ratón primarios; IC_{50} 0,49 pM para M70 frente a 3,96 pM para FGF19 en hepatocitos de rata primarios; IC_{50} 6,80 pM para M70 frente a 1,73 pM para FGF19 en hepatocitos humanos primarios; figura 9F). En hepatocitos humanos primarios, la adición de FGF19 produce una máxima supresión del ARNm de Cyp7a1 en 97%. De manera similar, el M70 fue capaz de reducir la expresión de Cyp7a1 en 98% (figura 9F).

Para evaluar los efectos agudos de la administración de M70 sobre la expresión hepática de Cyp7a1 *in vivo*, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de proteína de M70 o FGF19 recombinante a unas dosis que varían de 0,001 a 10 mg/kg (figura 9G). Una única inyección intraperitoneal de M70 suprimió con gran fuerza el ARNm de Cyp7a1 con una ED_{50} de 1,29 μ g/kg (figura 9G). Estos datos demuestran que la administración sistémica de M70 puede activar, con gran potencia y rapidez, reacciones intracelulares mediadas por FGFR4 *in vivo*.

En resumen, M70 y FGF19 de tipo salvaje muestran un perfil comparable de actividades biológicas, que conducen a la activación de la señalización de ERK y la regulación de Cyp7a1.

Ejemplo 10: El M70 muestra una activación de vías de señalización diferencial comparado con FGF19

5 El M70 se une al complejo de receptor FGFR4 y activa la vía de señalización intracelular que conduce a la represión de Cyp7a1, pero no estimula la formación de tumores hepáticos en los modelos de ratón *db/db* o *rasH2*. Para aclarar la base molecular de la falta de potencial tumorigénico, se analizó la activación de proteínas de señalización cruciales implicadas en la tumorigénesis, que incluyen las vías de ERK, PI3K/AKT, STAT, y WNT/ β -catenina.

10 Las proteínas M70 y FGF19 (1 mg/kg) se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones *db/db*. Los hígados se recolectaron 15 minutos (los datos no se muestran), 2 horas (figura 10A), y 4 horas (los datos no se muestran) después y se midió la fosforilación de las proteínas de señalización mediante inmunotransferencia. En coherencia con la capacidad de ambas moléculas para la señalización en hepatocitos primarios cultivados, FGF19 y M70 estimulan la fosforilación de ERK en un grado similar en tejidos hepáticos *in vivo*. En línea con los informes previos sobre el papel de FGF19 en la modulación de la síntesis de proteínas hepáticas (Kir *et al.*, 2011, *Science*, 331, 1621-1624), ambos FGF19 de tipo salvaje y M70 inducen una robusta fosforilación de la proteína S6 ribosómica en el hígado (figura 10; los datos no se muestran). Esto está de acuerdo con la idea de que M70 conserva la actividad sobre el complejo de receptor FGFR4-KLB. Ninguno de M70 o FGF19 tuvo ningún efecto sobre los niveles hepáticos de AKT fosforilada. No se observó activación de GSK3 β ni β -catenina en los tres momentos ensayados.

20 De modo notable, FGF19 induce la fosforilación de STAT3 2 horas después de la dosificación (figura 10A). Este efecto duró hasta las 4 horas después de la dosificación (los datos no se muestran). Por contraste, M70 no aumenta la fosforilación de STAT3 (figura 10A). Se demostró que la IL-6, un activador de STAT3 conocido, estaba sobrerregulada en los hígados tratados con FGF19 pero no con M70 (figura 10B). Es probable que esta activación de pSTAT3 por FGF19 sea debida a mecanismos autónomos no celulares en el hígado, puesto que no se observó inducción de pSTAT3 15 minutos después de la inyección de proteínas ni en un cultivo de hepatocitos de ratón primarios (los datos no se muestran). Corroborando la fosforilación y activación de STAT3, se observó una mayor expresión de los genes diana de STAT3, que incluyen *survivina*, *bcl-X_L*, y *ciclina D1*, en hígados de *rasH2* que expresan FGF19, pero no M70 (figura 10C). Puesto que STAT3 es un oncogén que con frecuencia se activa en HCC (He y Karin, 2011, *Cell Res.*, 21, 159-168), su activación por FGF19 plantea un mecanismo plausible para la hepatocarcinogenicidad inducida por FGF19. La incapacidad de M70 para activar la vía de STAT3 puede contribuir a su falta de tumorigenicidad *in vivo*.

25 Así, el M70 solo activa un subconjunto de vías de señalización corriente abajo de sus receptores, una característica de los moduladores selectivos (Kenakin y Christopoulos, 2013, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12, 205-221). La identificación y caracterización de M70 permite a los inventores definir dos procesos biológicos diferenciados regulados por la vía FGF19-FGFR4, la homeostasis del ácido biliar y la tumorigénesis.

Ejemplo 11: El M70 inhibe la formación de tumores mediada por FGF19

35 La observación de los inventores sugiere que M70 se comporta como modulador selectivo o un "ligando sesgado" para activar la señalización metabólica, pero no las señales tumorigénicas procedentes de FGFR4. Después se determinó si el agonismo sesgado de M70 puede utilizarse para inhibir la formación de tumores asociada a FGF19 a través de un mecanismo ortostérico o alostérico.

40 Ratones *db/db* fueron inyectados con 3×10^{10} copias del genoma de AAV-FGF19, con o sin un exceso molar en 10 veces de AAV-M70 (3×10^{11} copias del genoma). Se realizó una necropsia a los ratones 24 semanas después de la expresión de los transgenes, y los hígados se extirparon para el análisis. Mientras que la expresión ectópica de FGF19 en ratones *db/db* estimula la formación de nódulos tumorales sobre la superficie hepática (7,8 + 2,3 nódulos tumorales por hígado), los hígados de ratones que expresan ambos FGF19 y M70 estaban completamente exentos de nódulos tumorales (figura 11A). El peso del hígado de ratones que coexpresan M70 es significativamente menor, con relación a los ratones que expresan FGF19 (1,59 g \pm 0,14 g y 2,42 g \pm 0,20 g, respectivamente, n = 5, p < 0,01; figura 11B). Las proporciones de peso del hígado a peso corporal en ratones cotratados con M70 y FGF19 no fueron significativamente diferentes de las de los ratones control (figura 11C). Los niveles en suero de FGF19 fueron de 94 \pm 12 ng/ml cuando se dosifica por sí solo, y el nivel en suero combinado de FGF19 y M70 fue de 453 \pm 169 ng/ml (figura 11D). Los análisis histológicos de los hígados confirman que, a diferencia de los ratones que expresan FGF19, los ratones que coexpresan M70 y FGF19 no muestran pruebas histológicas de tumores hepáticos (figura 11E). Estos datos demuestran que M70 compite con eficacia con FGF19 para evitar la formación de tumores en ratones que expresan FGF19.

55 Se ha indicado que FGF19 está amplificado y/o se sobreexpresa en HCC y cáncer de colon (Desnoyers *et al.*, 2008; Sawey *et al.*, 2011, *Oncogene*, 27, 85-97). Se seleccionó un panel de líneas celulares de cáncer de hígado, colon, mama y otros cánceres humanos, y se observó que FGF19 es producido y segregado, entre otras, por las líneas celulares Huh-7 (HCC) y HCT-116 (cáncer de colon) (figura 11F), que se seleccionaron para posteriores estudios. Los niveles de FGF19 en el medio de cultivo alcanzaron 1-2 ng/ml mediante una medición de ELISA, un nivel aproximadamente 10 veces mayor que la concentración de FGF19 fisiológica en seres humanos.

- La línea celular de HCC Huh-7 porta el amplicón 11q13.3 y sobreexpresa FGF19 y CCND1. Se ensayó el efecto de M70 sobre la capacidad formadora de tumores de células Huh. Ratones “nude” atímicos fueron inyectados por vía subcutánea con células Huh-7, y se dejó que los tumores alcanzasen un tamaño de aproximadamente 100 mm³. En este momento, los ratones se dividieron en 2 grupos de tratamiento: a uno se le inyectó por vía intravenosa AAV-M70, y al otro un virus control. Los ratones tratados con M70 mostraron una tendencia a un crecimiento retrasado en 28% (tamaño del tumor en el estadio final: 1856 ± 348 mm³ en los controles frente a 1340 ± 406 mm³ después del tratamiento con M70; n = 10; figura 11G). No se advirtió ningún efecto significativo sobre el peso corporal (los datos no se muestran).
- También se estudió el efecto de M70 sobre el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de colon HCT-116. Ratones que portan tumores de cáncer de colon HCT116 establecidos se dosificaron con AAV-M70 o virus control. Tan pronto como en el día 8 después de comenzar el tratamiento, M70 suprime el crecimiento tumoral en 37% (tamaño del tumor: 459 ± 83 mm³ en el grupo control frente a 287 ± 87 mm³ en el grupo de M70; n = 5; figura 11H). En el día 15 después del tratamiento, los ratones tratados con M70 mostraron una inhibición estadísticamente significativa del 71% del crecimiento tumoral (tamaño del tumor en el estadio final: 1634 ± 524 mm³ en los controles frente a 479 ± 155 mm³ después del tratamiento con M70, n = 5, p<0,001; figuras 11H y 11I). No se observó ningún efecto significativo sobre el peso corporal (figura 11J).
- Estos resultados sugieren que M70 actúa como un ligando sesgado que es capaz de antagonizar el FGF19 de tipo salvaje en la señalización tumorigénica, y demuestran el potencial de usar un modulador selectivo, tal como M70, para suprimir el crecimiento tumoral dependiente de FGF19.
- Ejemplo 12: El M70 inhibe el crecimiento de tumores de colon CT26
- Este estudio se realizó para evaluar también el efecto de M70 sobre el avance del tumor en un modelo singénico en ratones inmunocompetentes. CT26 es una línea celular de cáncer colon de ratón que se injerta y crece bien en ratones Balb/c singénicos. Se ha utilizado mucho CT26 para caracterizar compuestos/agentes para el crecimiento tumoral, en especial para evaluar inmunoterapias del cáncer.
- Como control positivo se usó un anticuerpo de bloqueo contra Programmed Death-1 (PD-1, muerte programada-1). PD-1 y sus ligandos PD-L1/PD-L2 representan un eje de punto de control inmunológico. La vía de PD-1 infrarregula la inmunidad específica de tumor alterando las respuestas de células T y estimulando la inducción de Treg Foxp3+ en la periferia. El bloqueo de la vía de PD-1, junto con otras terapias inmunológicas, inhibe el avance del tumor en modelos singénicos. Múltiples anticuerpos monoclonales (mAb) anti-PD-1 humanos, así como mAb anti-PD-L1 humanos, han sido incluidos en ensayos clínicos, y el primer anticuerpo anti-PD-1 ha sido recientemente aprobado por la FDA como terapia anticáncer.
- Los ratones Balb/c se adquirieron en Jackson Laboratory. Los animales se mantuvieron en unas instalaciones sin patógenos. Todos los protocolos con animales fueron aprobados por Institutional Animal Care and Use Committee de NGM Biopharmaceuticals.
- La línea celular de cáncer de colon de ratón CT26 se adquirió en ATCC. Las células se cultivaron en DMEM con FBS al 10% y cóctel de penicilina/estreptomicina. Las células en crecimiento exponencial se recolectaron para su implantación en ratones. Las células se resuspendieron en disolución salina para inyección.
- Los ratones Balb/c fueron implantados con 1×10⁶ células CT26 en el flanco derecho. Tres días después, la proteína M70 fue inyectada por vía subcutánea en ratones Balb/c que portan el implante de CT26 una vez diaria durante 15 días. El crecimiento del tumor CT26 se midió dos veces semanales con un calibrador. Se calculó el volumen tumoral usando la fórmula: Volumen tumoral = anchura²*longitud/2.
- Tal como se muestra en la figura 13, el M70 retrasa el crecimiento tumoral en un modelo de ratón singénico de cáncer de colon CT26 tras la administración de dosis de 10 mg/kg (figura 13A) o dosis de 3 mg/kg (figura 13B), comparado con el vehículo por sí solo. También se demostró que M70 reduce el peso corporal tras la administración de dosis de 10 mg/kg (figura 14A) o dosis de 3 mg/kg (figura 14B).
- Por tanto, estos estudios demuestran que el tratamiento con M70 retrasa el crecimiento del tumor de colon CT26 en ratones singénicos Balb/c inmunocompetentes, observándose eficacia antitumoral con ambas dosis (3 mg/kg y 10 mg/kg) de M70.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> NGM Biopharmaceuticals, Inc.
LING, Lei
- 5 <120> Modelos de cáncer y métodos asociados
<130> 13370-020-228
- <140>
10 <141>
- <150> 61/896,473
<151> 28-10-2013
- 15 <150> 61/922,586
<151> 31-12-2013
- <150> 62/067,273
<151> 22-10-2014
- 20 <160> 42
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
<211> 190
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Secuencia M70
- 35 <400> 1
Met Arg Asp Ser Ser Pro Leu Val His Tyr Gly Trp Gly Asp Pro Ile
1 5 10 15
Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys
20 25 30
Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln
35 40 45
Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val
50 55 60
Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp
65 70 75 80
Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe
85 90 95
Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys
100 105 110
His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr
115 120 125
Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro
130 135 140
Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp
145 150 155 160
Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu
165 170 175
Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
180 185 190
- <210> 2
40 <211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de marcador FLAG (u octapéptido FLAG)

<400> 2
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 5 1 5

<210> 3
 <211> 194
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Secuencia FGF19

15 <400> 3
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp
 1 5 10 15
 Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly
 20 25 30
 Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys
 35 40 45
 Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala
 50 55 60
 Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys
 65 70 75 80
 Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu
 85 90 95
 Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
 100 105 110
 Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln
 115 120 125
 Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu
 130 135 140
 Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His
 145 150 155 160
 Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp
 165 170 175
 Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe
 180 185 190
 Glu Lys

<210> 4
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 4
 Trp Gly Asp Pro Ile
 1 5

<210> 5
 30 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> Secuencia M5

<400> 5

ES 2 753 264 T3

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

<210> 6
 <211> 187
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia M6

10 <400> 6
 Arg Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Leu Arg
 1 5 10 15
 His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg
 20 25 30
 Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His
 35 40 45
 Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys
 50 55 60
 Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Lys Met
 65 70 75 80
 Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu
 85 90 95
 Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu
 100 105 110
 Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg
 115 120 125
 Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro
 130 135 140
 Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly
 165 170 175
 Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185

15 <210> 7
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia M7

<400> 7

ES 2 753 264 T3

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

<210> 8
 <211> 191
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia M14

10 <400> 8
 Arg His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro His Val His Tyr Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser
 20 25 30
 Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly
 35 40 45
 Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr
 50 55 60
 Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala
 65 70 75 80
 Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala
 85 90 95
 Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu
 100 105 110
 Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu
 115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu
 130 135 140
 Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser
 145 150 155 160
 Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly
 165 170 175
 Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

15 <210> 9
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia M15

<400> 9

ES 2 753 264 T3

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

<210> 10
 <211> 191
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia M32

10 <400> 10
 Arg His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Asp Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser
 20 25 30
 Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly
 35 40 45
 Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr
 50 55 60
 Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala
 65 70 75 80
 Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala
 85 90 95
 Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu
 100 105 110
 Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu
 115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu
 130 135 140
 Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser
 145 150 155 160
 Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly
 165 170 175
 Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

15 <210> 11
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia M36

<400> 11

ES 2 753 264 T3

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

<210> 12
 <211> 192
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia M43

10 <400> 12
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Gly
 1 5 10 15
 Asp Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser
 20 25 30
 Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg
 35 40 45
 Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg
 50 55 60
 Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys
 85 90 95
 Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser
 100 105 110
 Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln
 115 120 125
 Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met
 130 135 140
 Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu
 145 150 155 160
 Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe
 165 170 175
 Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

15 <210> 13
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia M50

<400> 13

ES 2 753 264 T3

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

<210> 14
 <211> 187
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia M52

10 <400> 14
 Arg Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Trp Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg
 1 5 10 15
 His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg
 20 25 30
 Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His
 35 40 45
 Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys
 50 55 60
 Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Lys Met
 65 70 75 80
 Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu
 85 90 95
 Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu
 100 105 110
 Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg
 115 120 125
 Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro
 130 135 140
 Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly
 165 170 175
 Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185

15 <210> 15
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia M53

<400> 15

ES 2 753 264 T3

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

5 <210> 16
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia M67

<400> 16
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val Trp Gly Asp Pro
 1 5 10 15
 Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser
 20 25 30
 Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly
 35 40 45
 Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr
 50 55 60
 Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala
 65 70 75 80
 Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala
 85 90 95
 Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu
 100 105 110
 Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu
 115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu
 130 135 140
 Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser
 145 150 155 160
 Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly
 165 170 175
 Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

15 <210> 17
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia M68

<400> 17

ES 2 753 264 T3

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

5 <210> 18
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia M69

<400> 18
 Arg Asp Ser Ser Pro Leu Val His Tyr Gly Trp Gly Asp Pro Ile Arg
 1 5 10 15
 Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe
 20 25 30
 Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser
 35 40 45
 Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala
 50 55 60
 Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly
 65 70 75 80
 Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu
 85 90 95
 Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His
 100 105 110
 Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys
 115 120 125
 Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met
 130 135 140
 Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met
 145 150 155 160
 Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val
 165 170 175
 Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185

15 <210> 19
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia M70

<400> 19

ES 2 753 264 T3

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

5 <210> 20
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia M75

<400> 20
 Arg Val His Tyr Gly Trp Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr
 1 5 10 15
 Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala
 20 25 30
 Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu
 35 40 45
 Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His
 50 55 60
 Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu
 65 70 75 80
 Leu Gln Tyr Ser Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro
 85 90 95
 Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser
 100 105 110
 Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu
 115 120 125
 Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro
 130 135 140
 Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu
 145 150 155 160
 Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala
 165 170 175
 Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180

15 <210> 21
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia M76

<400> 21

ES 2 753 264 T3

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

<210> 22
 <211> 175
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia M77

10 <400> 22
 Arg Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly
 20 25 30
 Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr
 35 40 45
 Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala
 50 55 60
 Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala
 65 70 75 80
 Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu
 85 90 95
 Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu
 100 105 110
 Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu
 115 120 125
 Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser
 130 135 140
 Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 165 170 175

15 <210> 23
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Secuencia M83

<400> 23

ES 2 753 264 T3

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

<210> 24
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia M84

<400> 24
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Ala His Val His Tyr Gly Trp
 1 5 10 15
 Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly
 20 25 30
 Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys
 35 40 45
 Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala
 50 55 60
 Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys
 65 70 75 80
 Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu
 85 90 95
 Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
 100 105 110
 Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln
 115 120 125
 Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu
 130 135 140
 Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His
 145 150 155 160
 Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp
 165 170 175
 Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe
 180 185 190
 Glu Lys

<210> 25
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia M140

ES 2 753 264 T3

<400> 25

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

<210> 26

5 <211> 190

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia M144 (M5-R)

<400> 26

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

15

<210> 27

<211> 186

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia M145 (M6-R)

ES 2 753 264 T3

<400> 27

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

<210> 28

5 <211> 190

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia M146 (M50-R)

<400> 28

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

15

<210> 29

<211> 194

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia M160

ES 2 753 264 T3

<400> 29
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp
 1 5 10 15
 Gly Asp Pro Ile Arg Gln Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly
 20 25 30
 Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys
 35 40 45
 Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala
 50 55 60
 Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys
 65 70 75 80
 Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu
 85 90 95
 Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
 100 105 110
 Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln
 115 120 125
 Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu
 130 135 140
 Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His
 145 150 155 160
 Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp
 165 170 175
 Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe
 180 185 190
 Glu Lys

5 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> residuos 47-57 of HIV-1 TAT

<400> 30
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

15 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 31
 Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg
 1 5 10

25 <210> 32
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 32
 Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
 1 5 10 15
 Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 20 25

35 <210> 33
 <211> 33
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 33
Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala
 1 5 10 15
Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu
 20 25 30
Ala

<210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 34
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

20 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 35
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5

30 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 36
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
 1 5

40 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Péptido sintético

50 <400> 37
Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
 1 5 10

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 38
 Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

5 <210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 39
 Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

15 <210> 40
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador directo

25 <400> 40
 ccgactagtc accatgcgga gcgggtgtgt gg 32

<210> 41
 <211> 41

30 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso

35 <400> 41
 ataagaatgc ggccgcttac ttctcaaagc tgggactcct c 41

<210> 42
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 42

ES 2 753 264 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un variante de FGF19 para su uso en un método para prevenir o tratar un cáncer o tumor dependiente de FGF19, o uno de sus síntomas, en un sujeto, o en un método para antagonizar la actividad oncogénica de FGF19 en un sujeto, en el que el variante de FGF19 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.
- 2.- El variante de FGF19 para el uso de la reivindicación 1, en el que el variante de FGF19 comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.
- 3.- El variante de FGF19 para el uso de la reivindicación 1, en el que el variante de FGF19 consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1.
- 10 4.- El variante de FGF19 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer o tumor dependiente de FGF19 es un carcinoma hepatocelular.
- 5.- El variante de FGF19 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer o tumor dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor de colon.
- 15 6.- El variante de FGF19 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer o tumor dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor de próstata.
- 7.- El variante de FGF19 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer o tumor dependiente de FGF19 es un cáncer o tumor de pulmón.
- 8.- El variante de FGF19 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto padece un trastorno metabólico.
- 20 9.- El variante de FGF19 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la reivindicación 8, en el que el sujeto muestra un indicio de un trastorno canceroso inducido por FGF19.
- 10.- El variante de FGF19 para el uso de la reivindicación 9, en el que el trastorno canceroso es un tumor.
- 11.- El variante de FGF19 para el uso de la reivindicación 10, en el que el tumor es un tumor hepático.
- 12.- El variante de FGF19 para el uso de la reivindicación 10, en el que el tumor es un tumor de colon.
- 25 13.- El variante de FGF19 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que el trastorno metabólico se selecciona del grupo que consiste en un trastorno hiperglucémico, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, obesidad y síndrome metabólico.
- 14.- El variante de FGF19 para el uso de la reivindicación 13, en el que el trastorno metabólico es un trastorno hiperglucémico.
- 30 15.- El variante de FGF19 para el uso de la reivindicación 14, en el que el trastorno metabólico es una diabetes.
- 16.- El variante de FGF19 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el sujeto es un animal o un ser humano.

FGF19 (SEQ ID NO:42):

RPLAFSDAGPHVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCF LRIRADGVV
DCARGQSAHSLLE IKAVALRTVA IKGVHSVRYLCMGADGKMQGLL
QYSEEDCAFE E E I RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFL
PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLES DMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE
AVRSPSF EKDYKDDDDK

FIG. 1

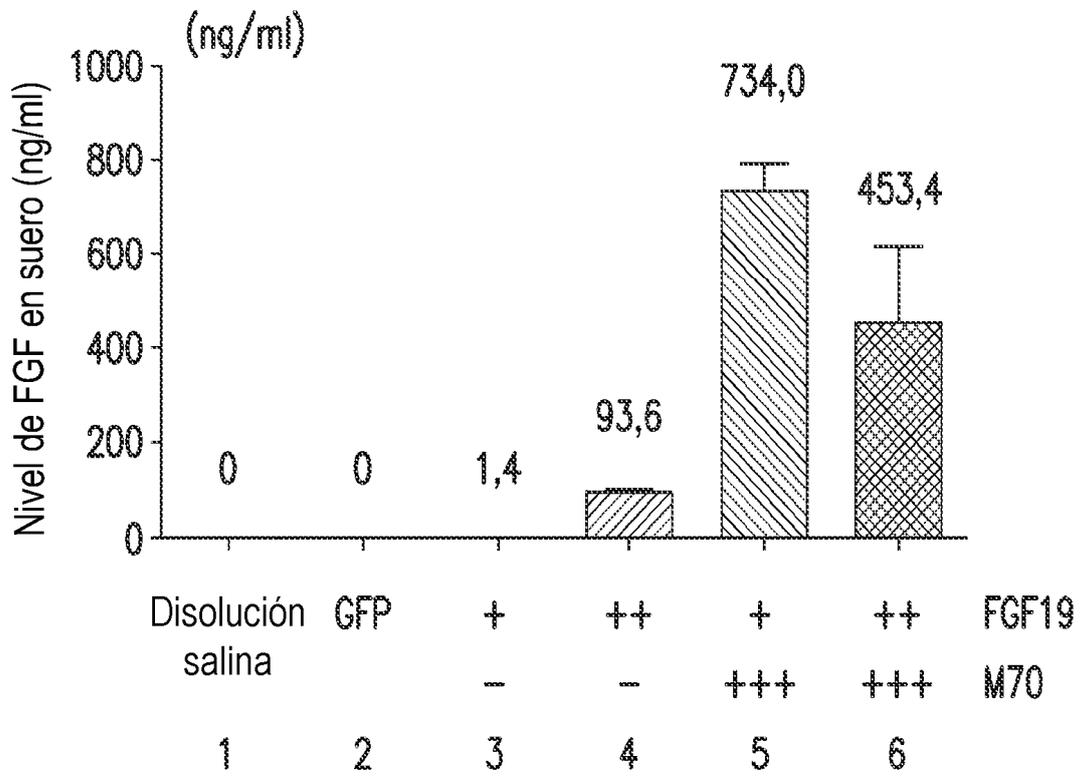


FIG.2

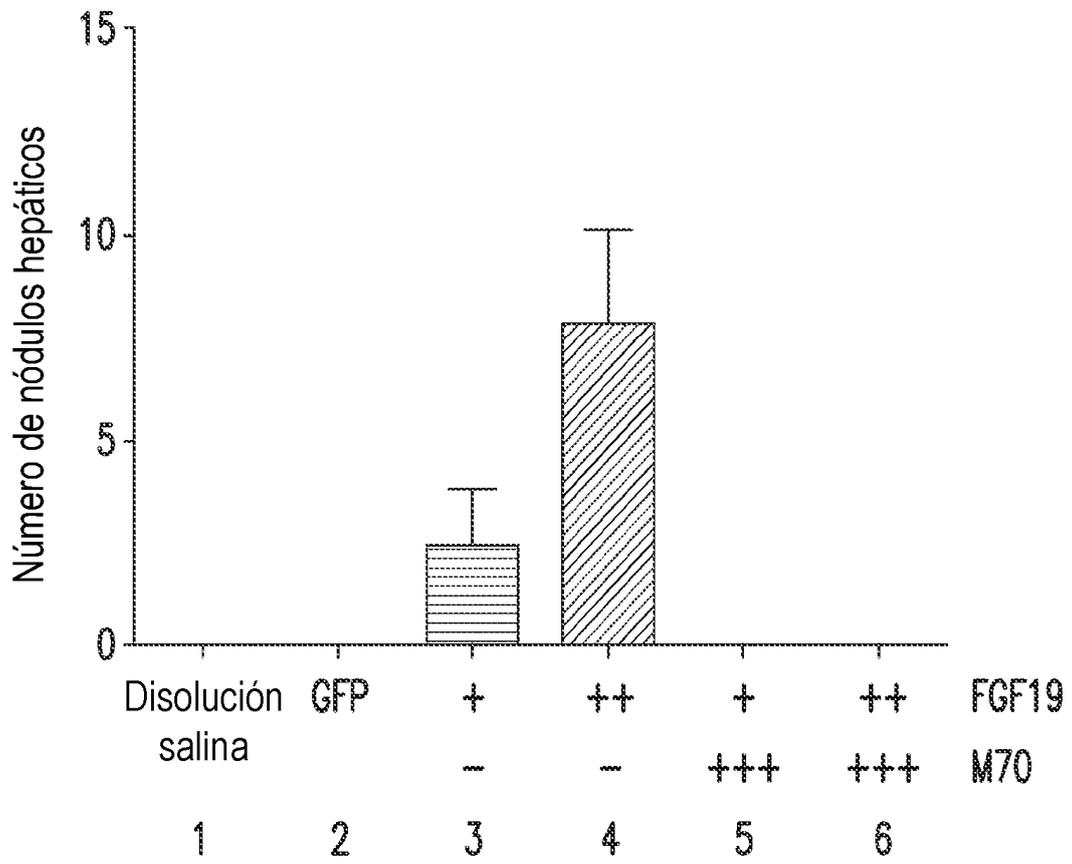


FIG. 3

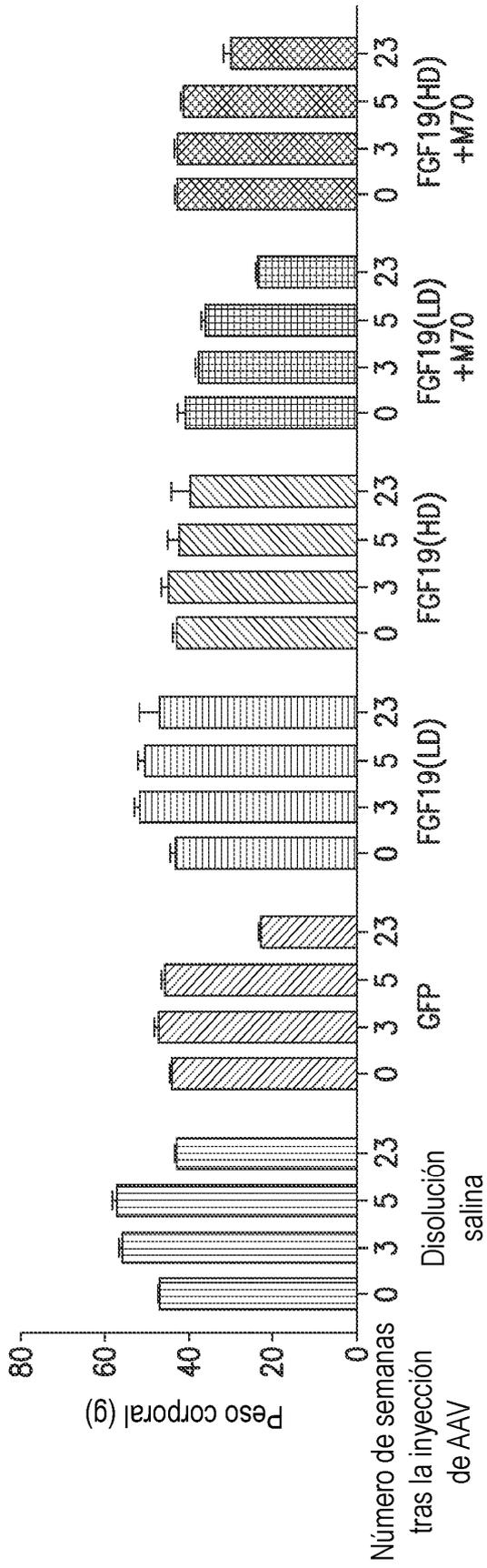


FIG.4

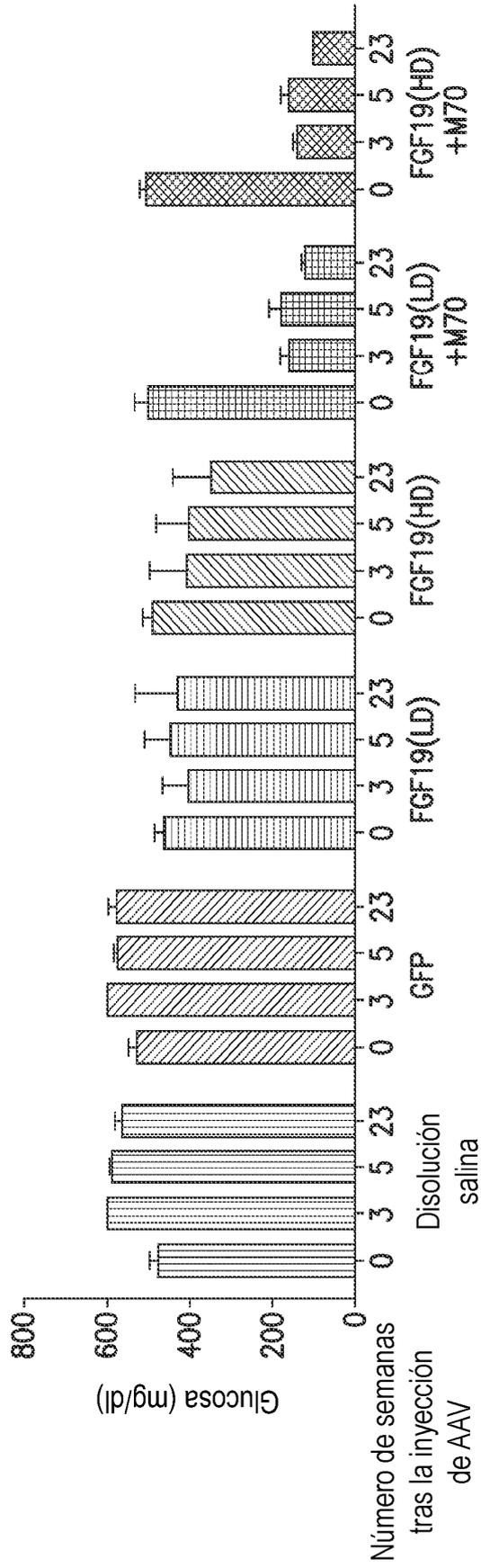


FIG.5

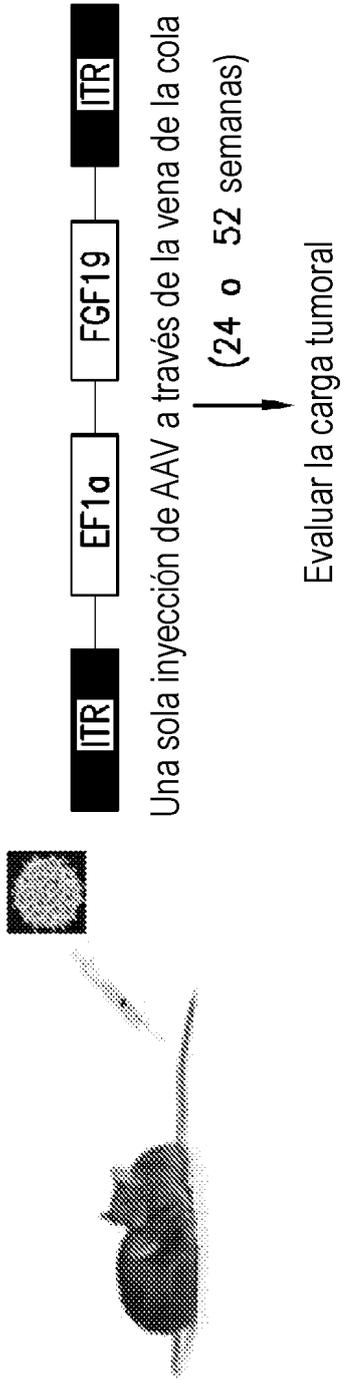


FIG. 6A

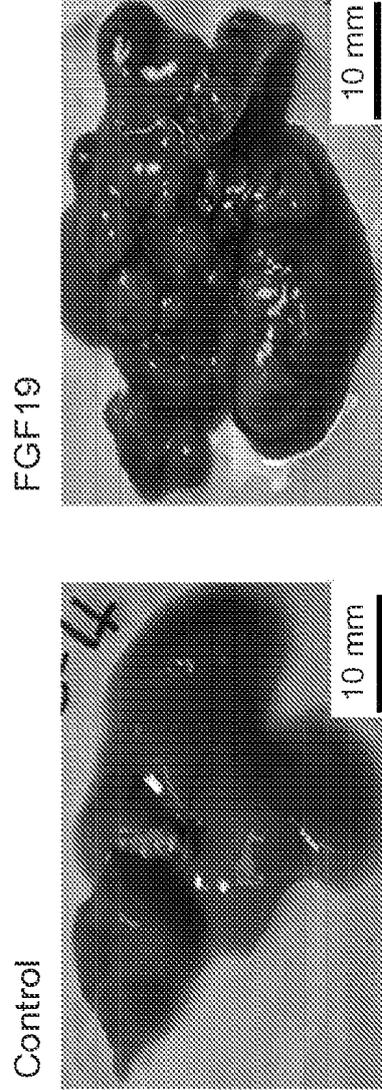


FIG. 6B

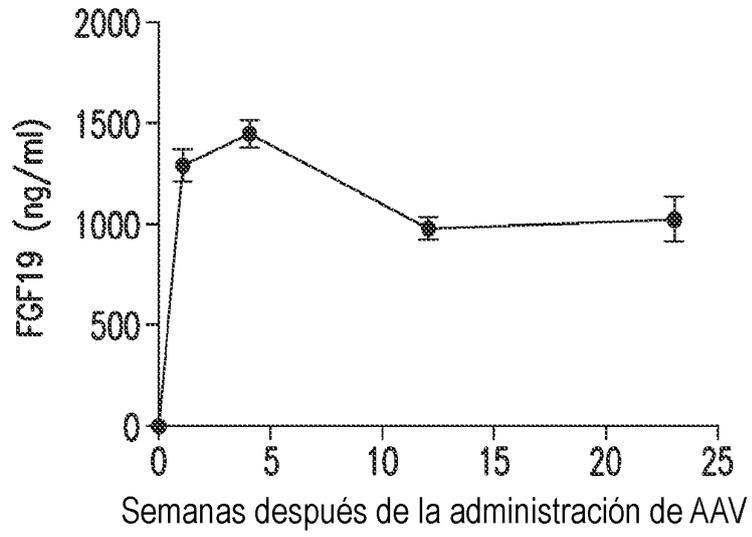


FIG. 6C

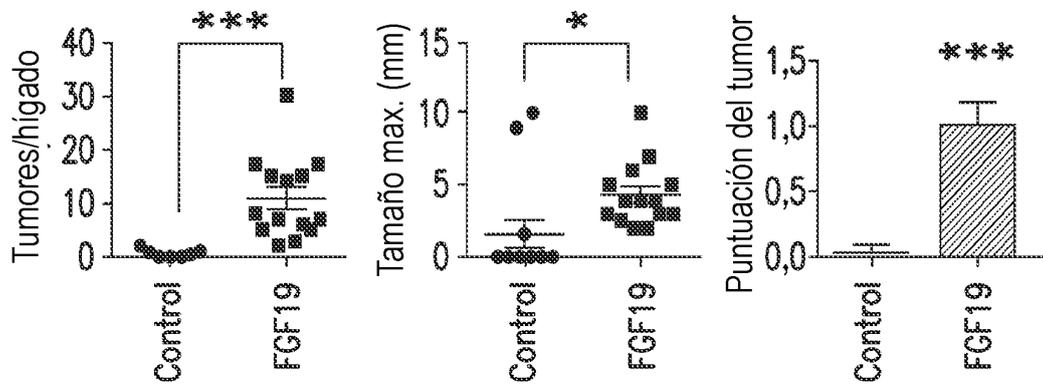


FIG. 6D

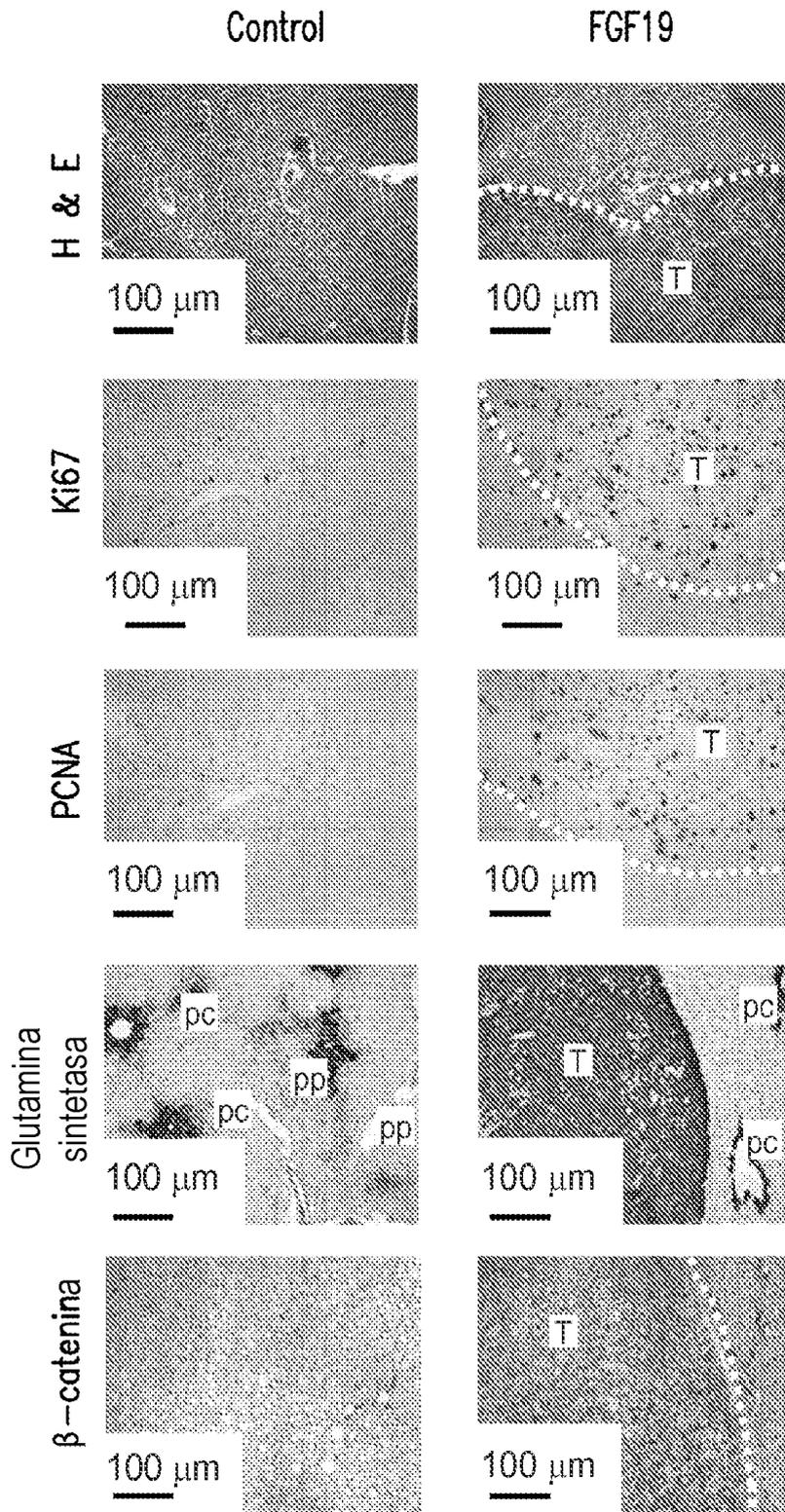


FIG.6E



FIG. 7A

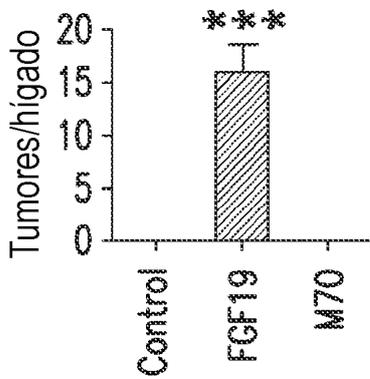


FIG. 7B

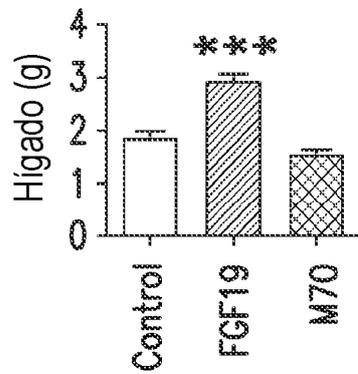


FIG. 7C

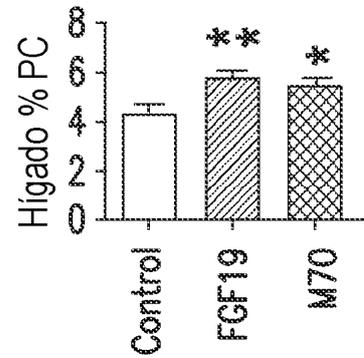


FIG. 7D

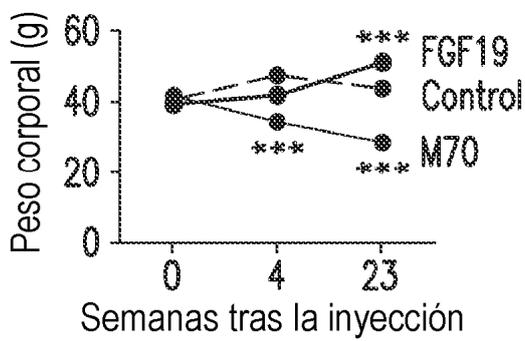


FIG. 7E

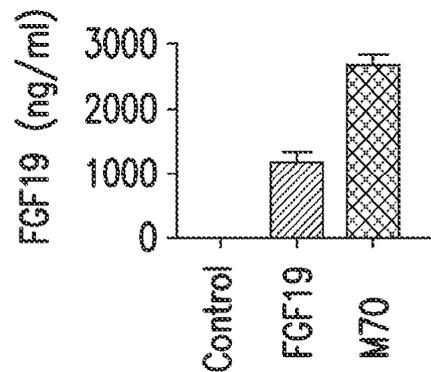


FIG. 7F

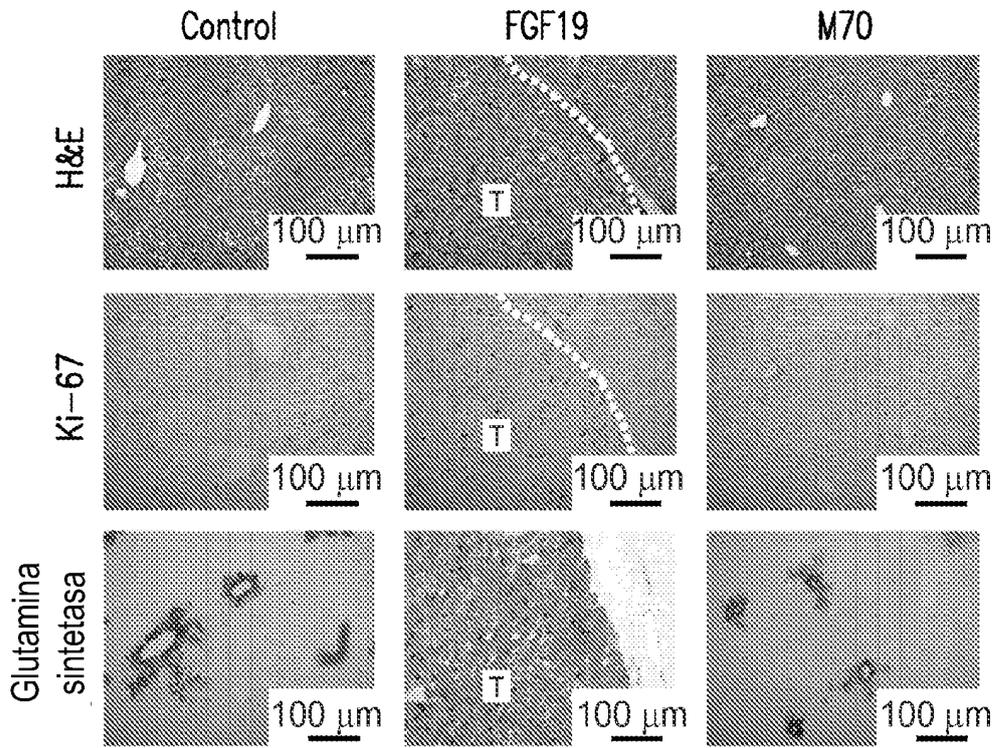


FIG.7G

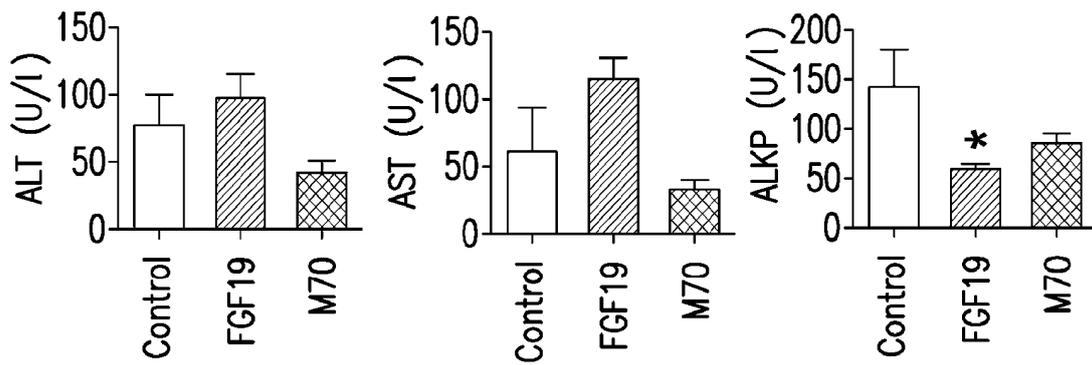


FIG.7H

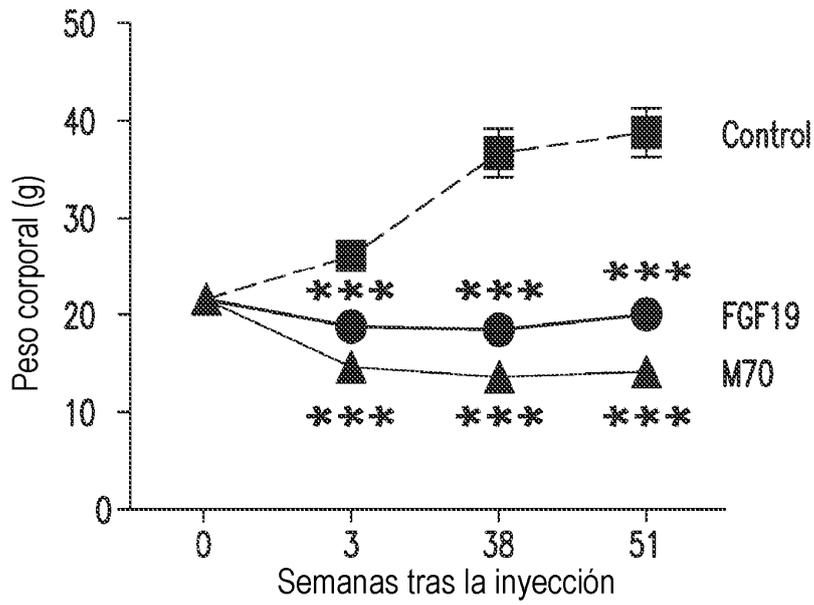


FIG.8A

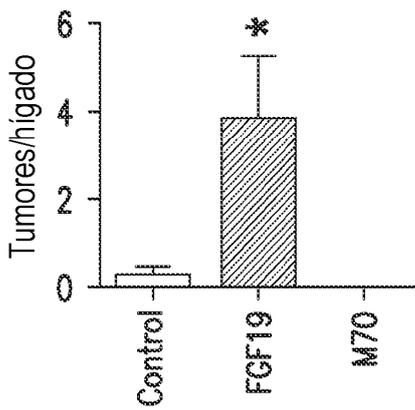


FIG.8B

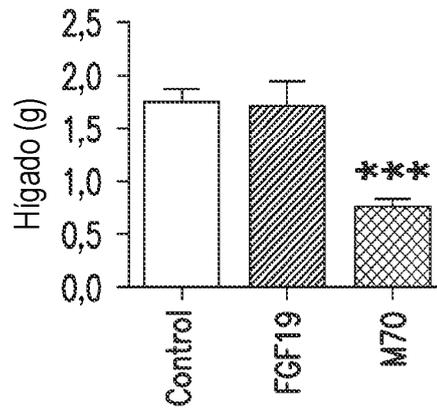


FIG.8C

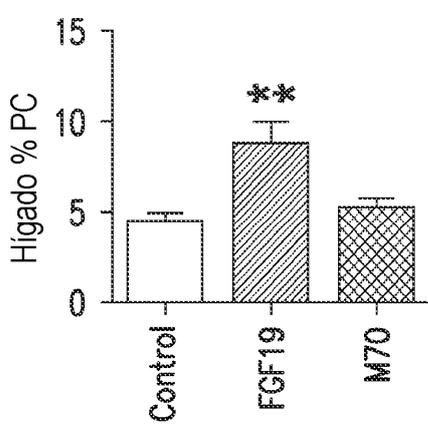


FIG.8D

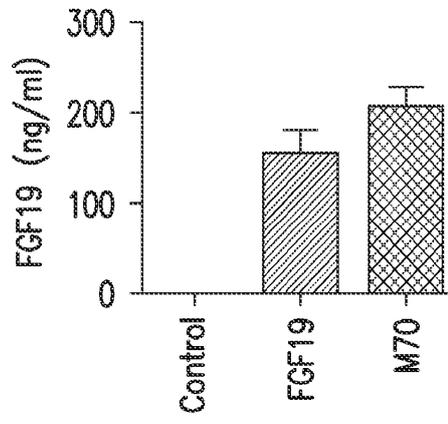


FIG.8E

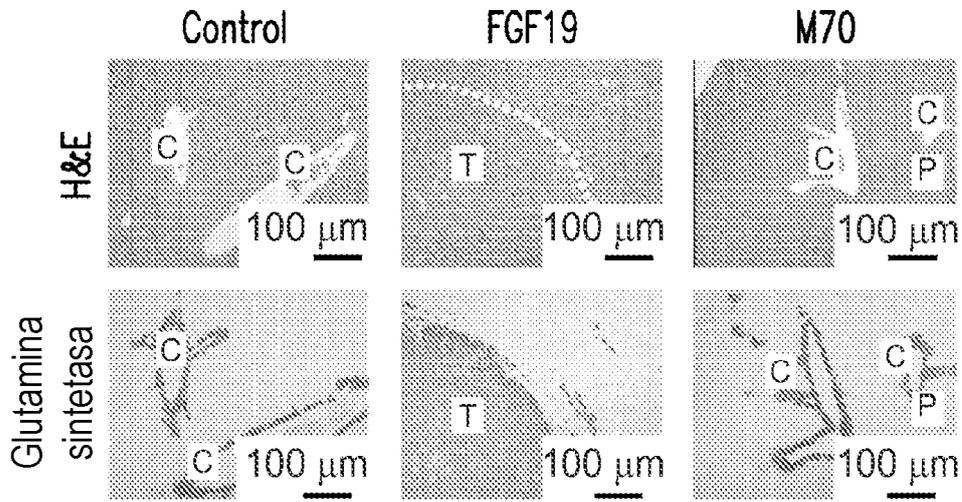


FIG.8F

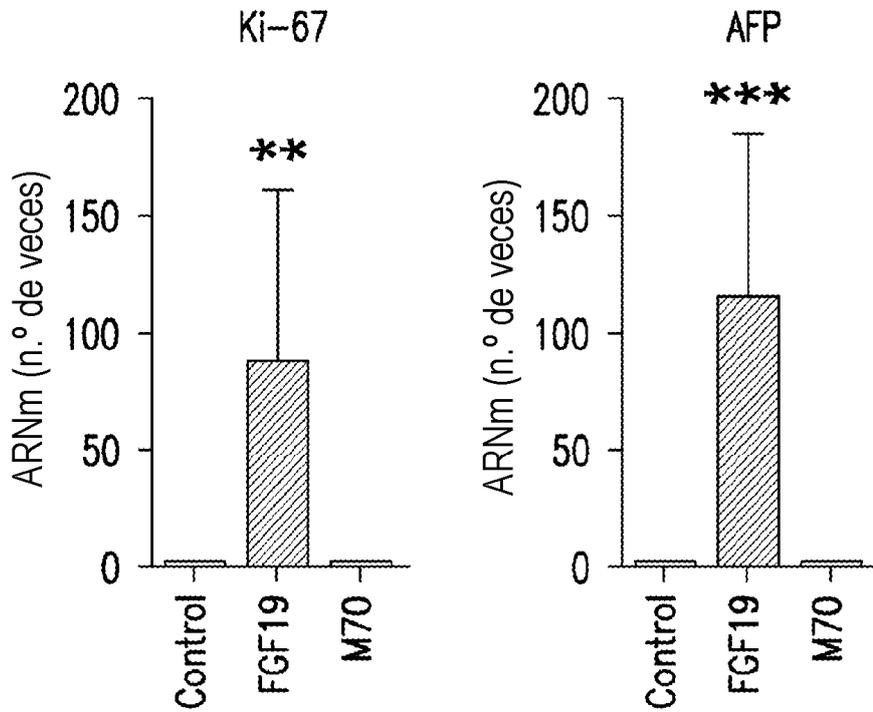


FIG.8G

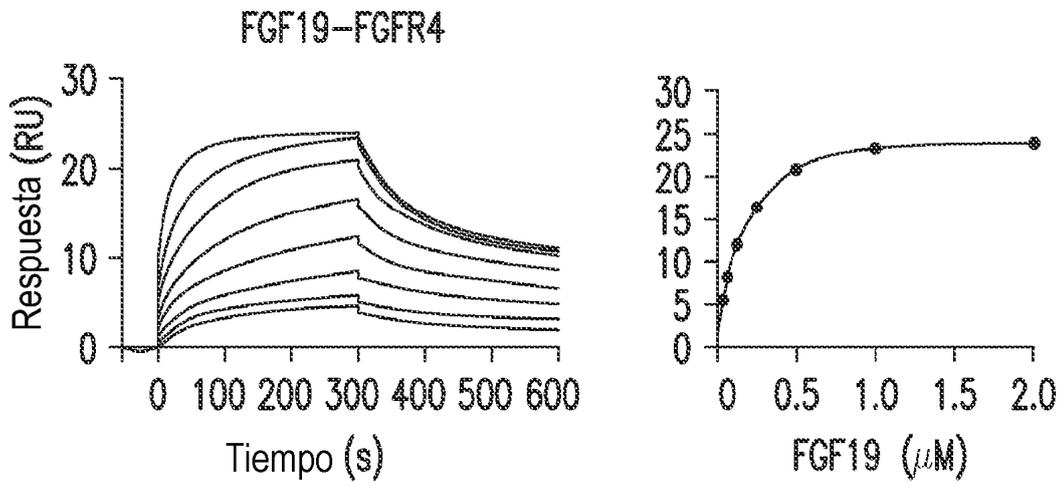


FIG.9A

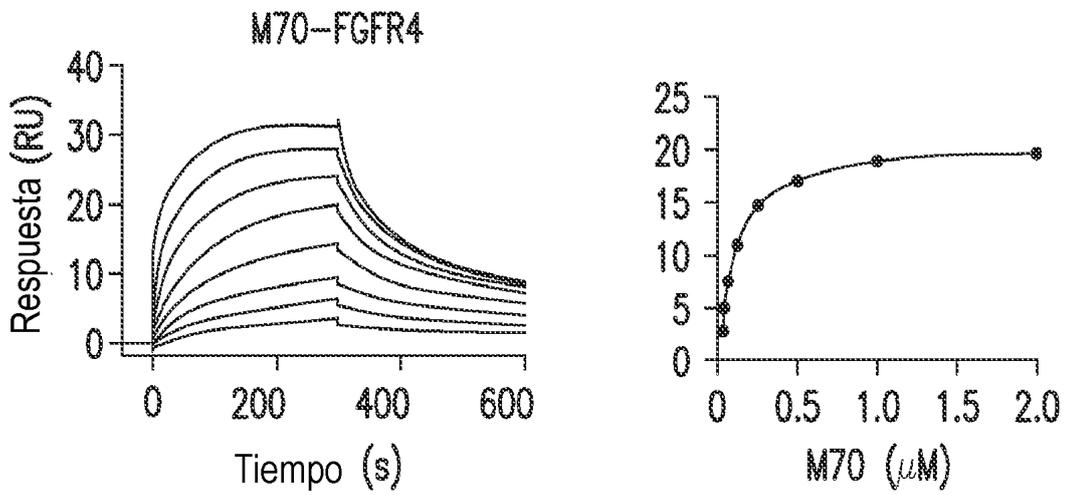


FIG.9B

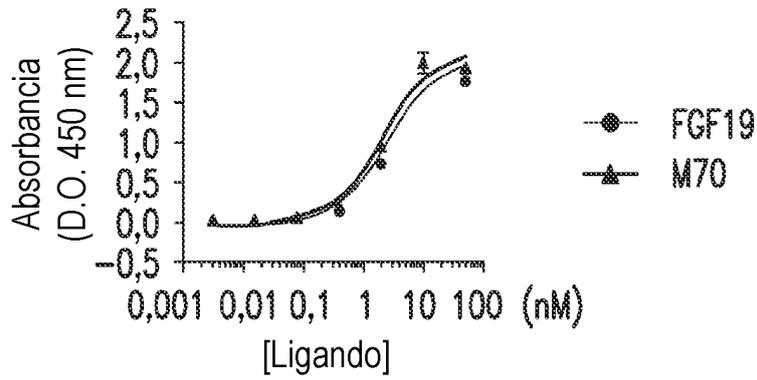


FIG. 9C

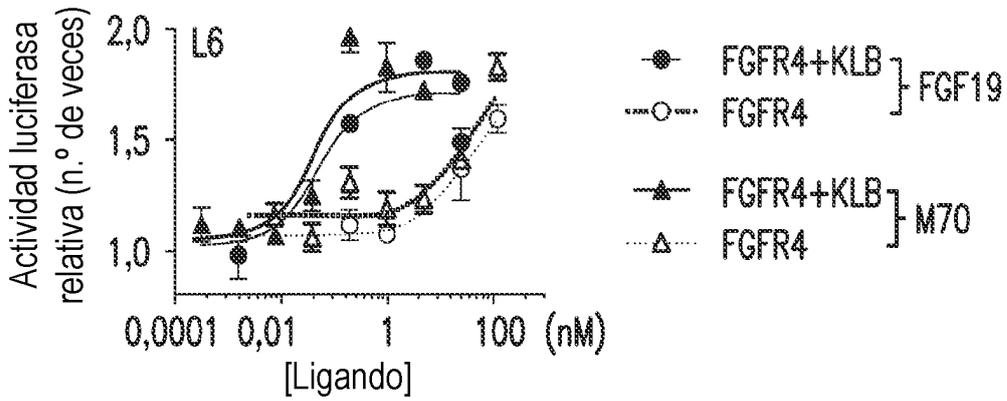


FIG. 9D

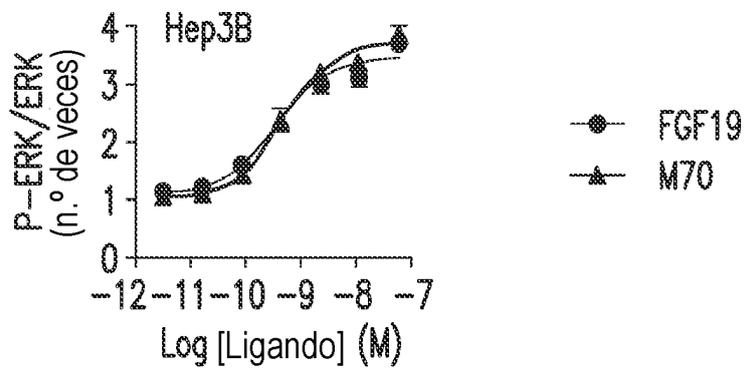


FIG. 9E

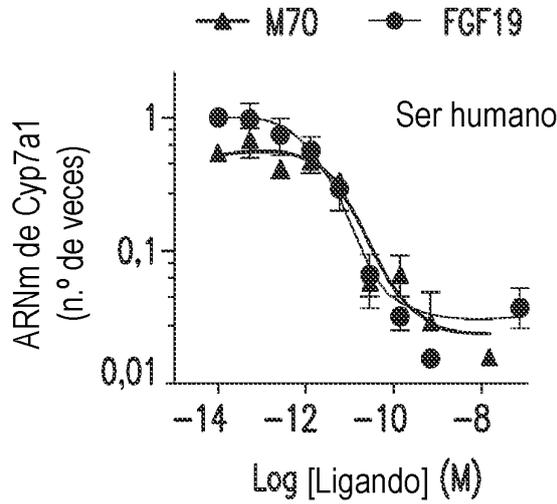
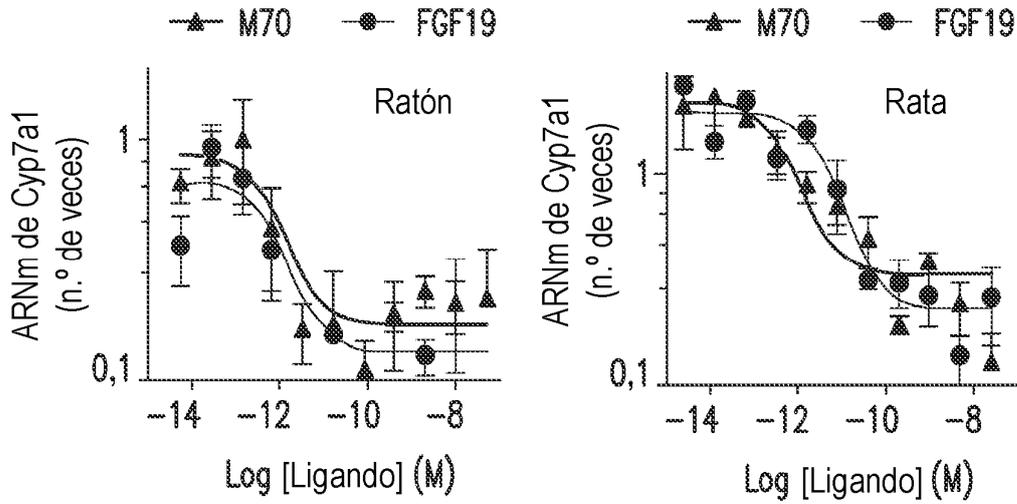


FIG.9F

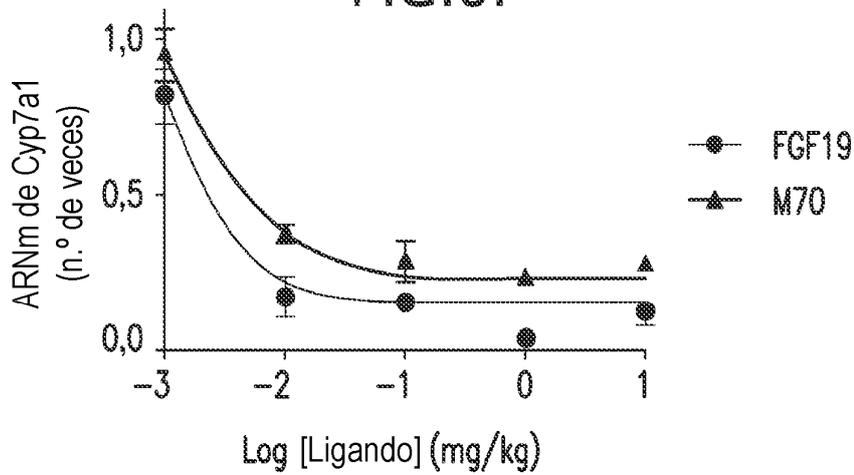


FIG.9G

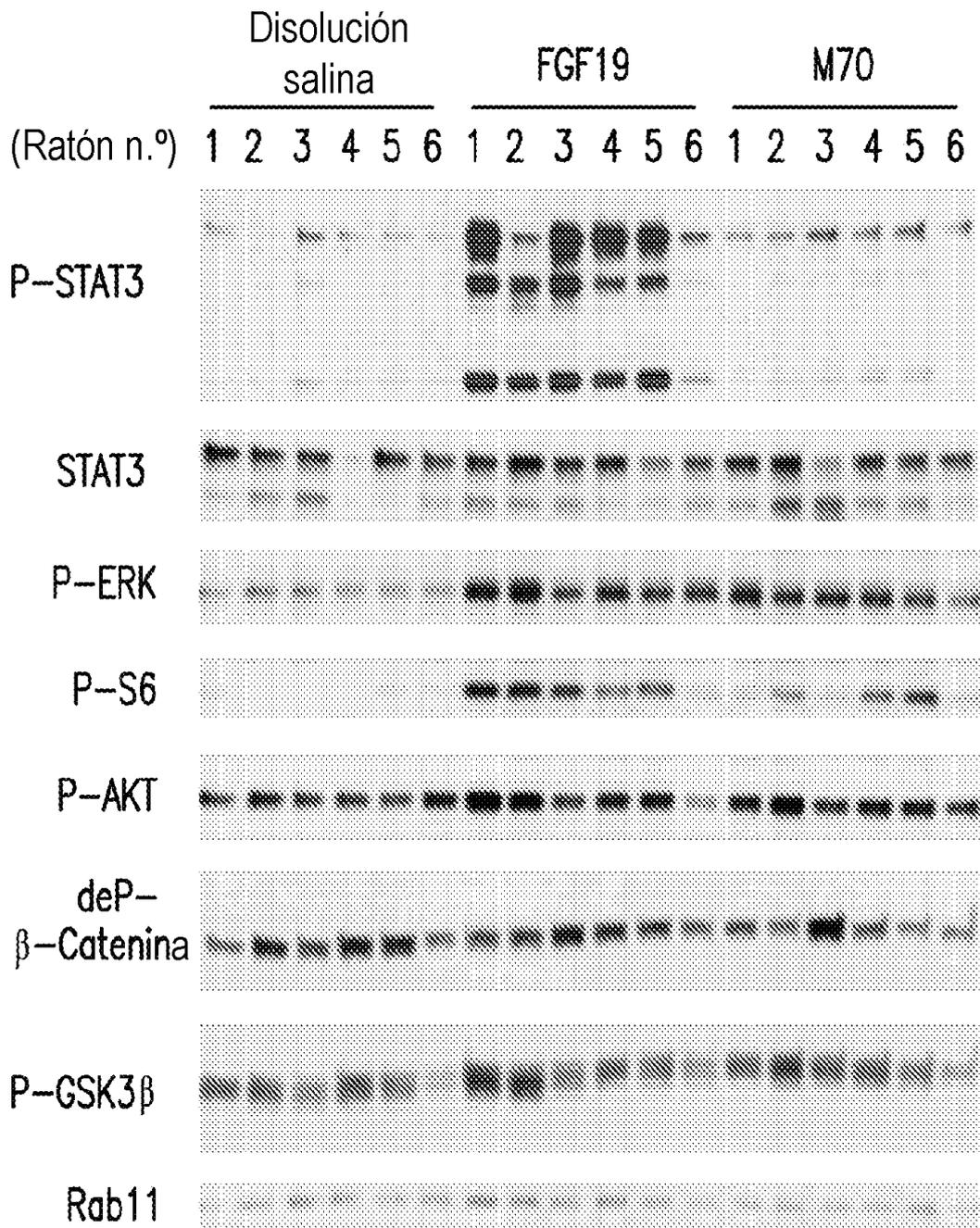


FIG.10A

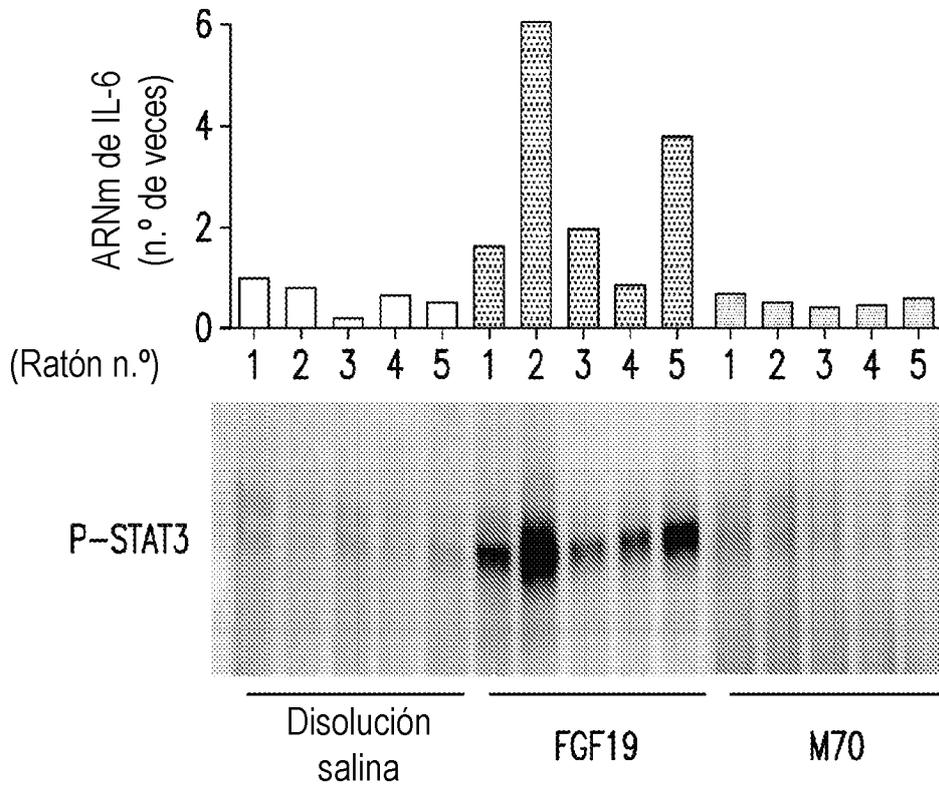


FIG. 10B

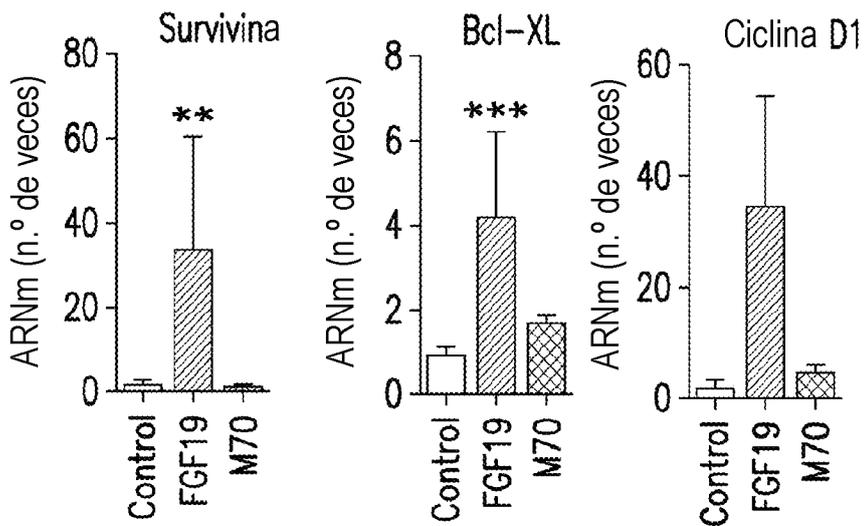


FIG. 10C

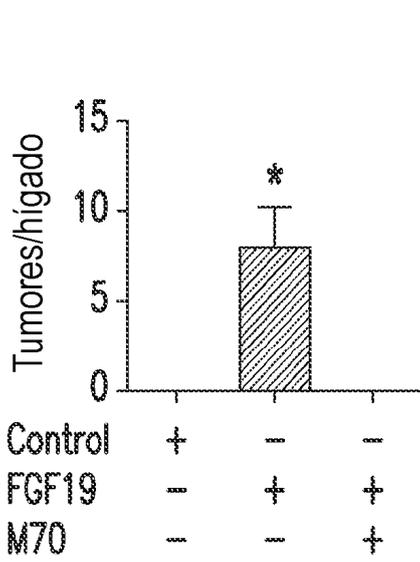


FIG.11A

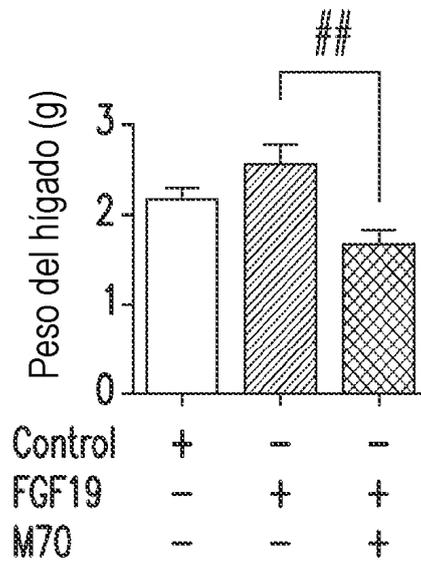


FIG.11B

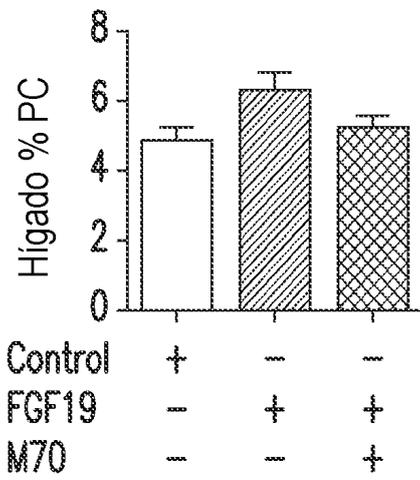


FIG.11C

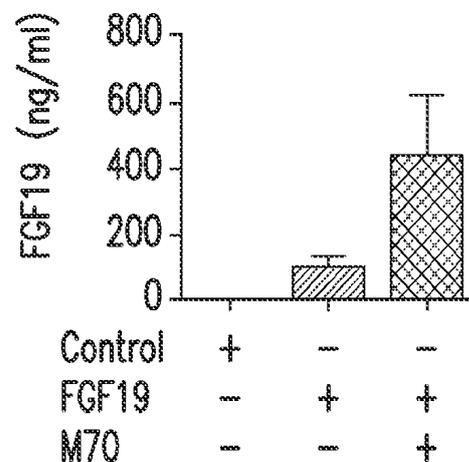


FIG.11D

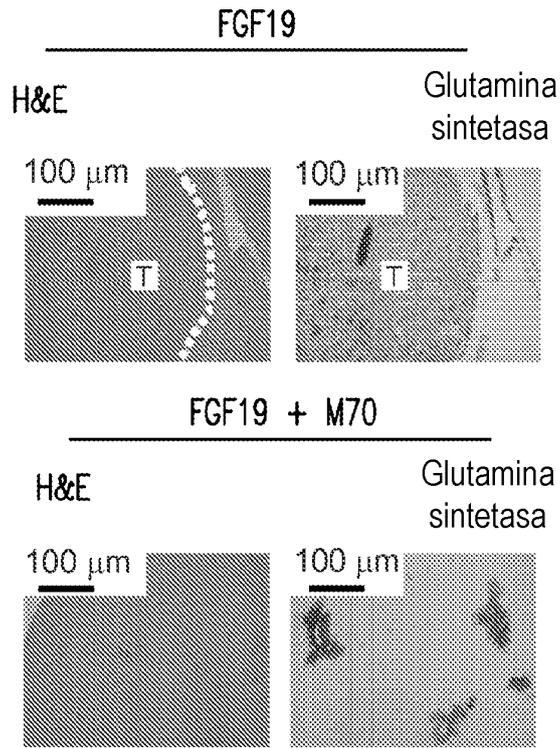


FIG.11E

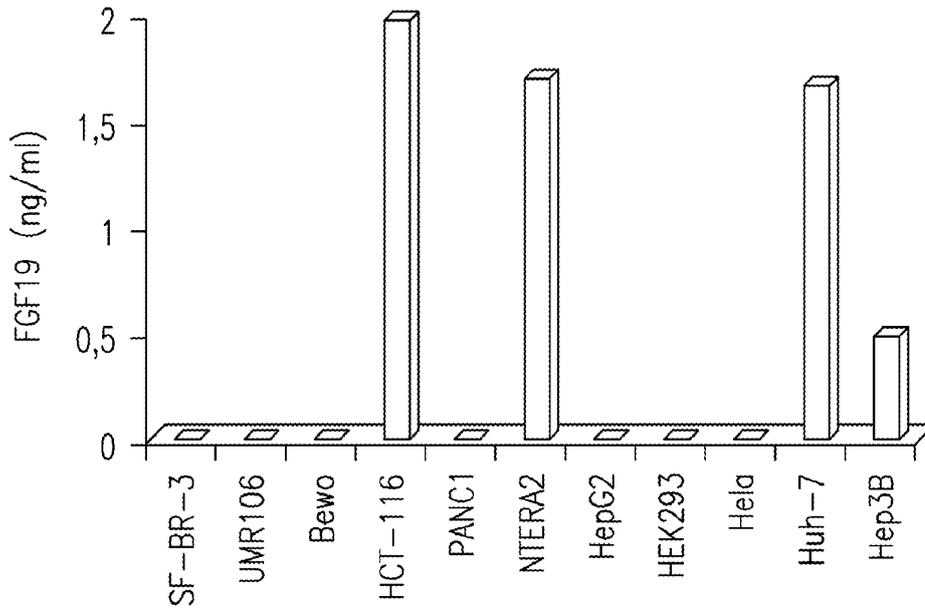


FIG.11F

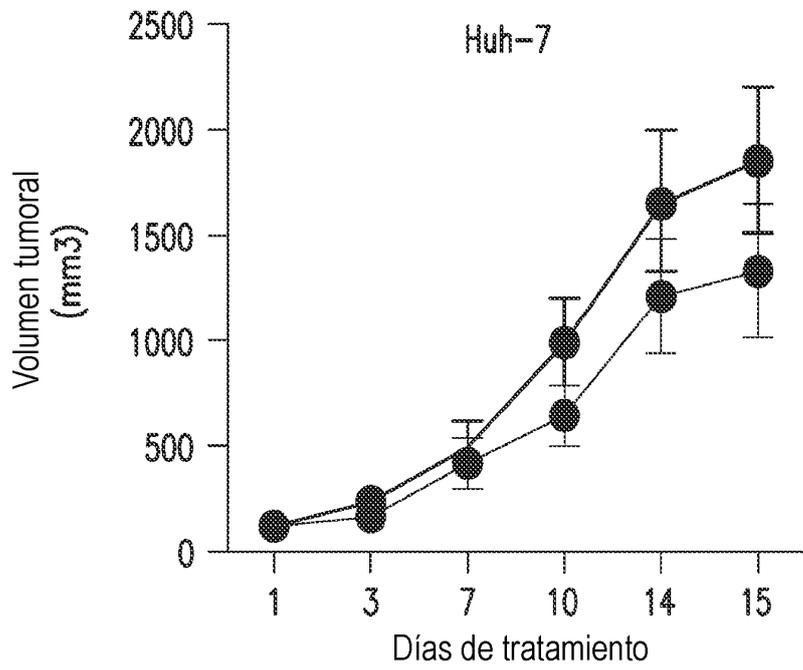


FIG.11G

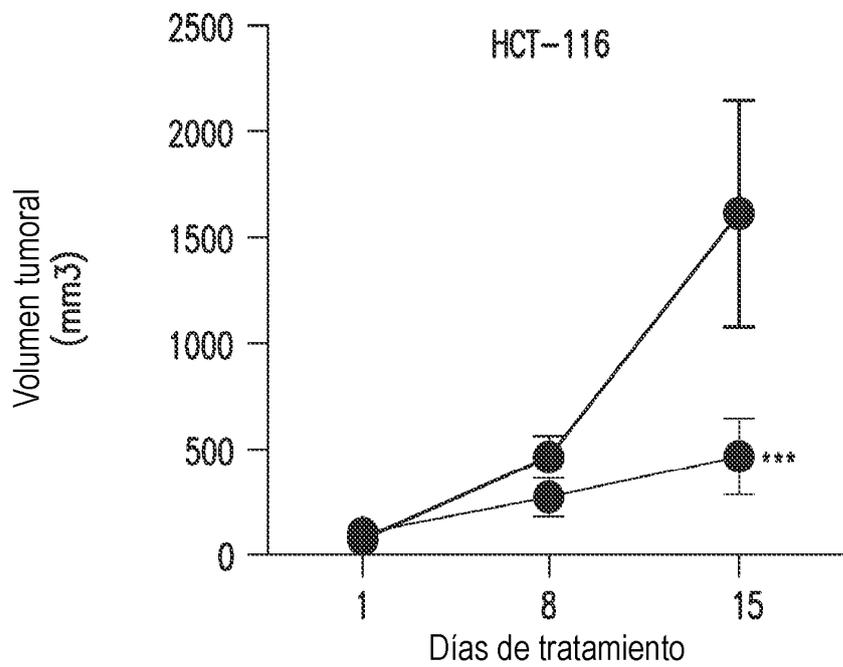


FIG.11H

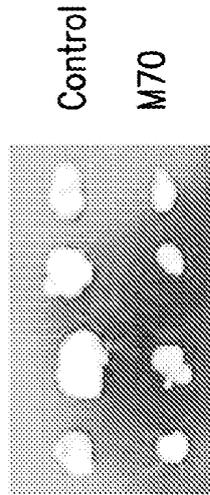


FIG. 11 I

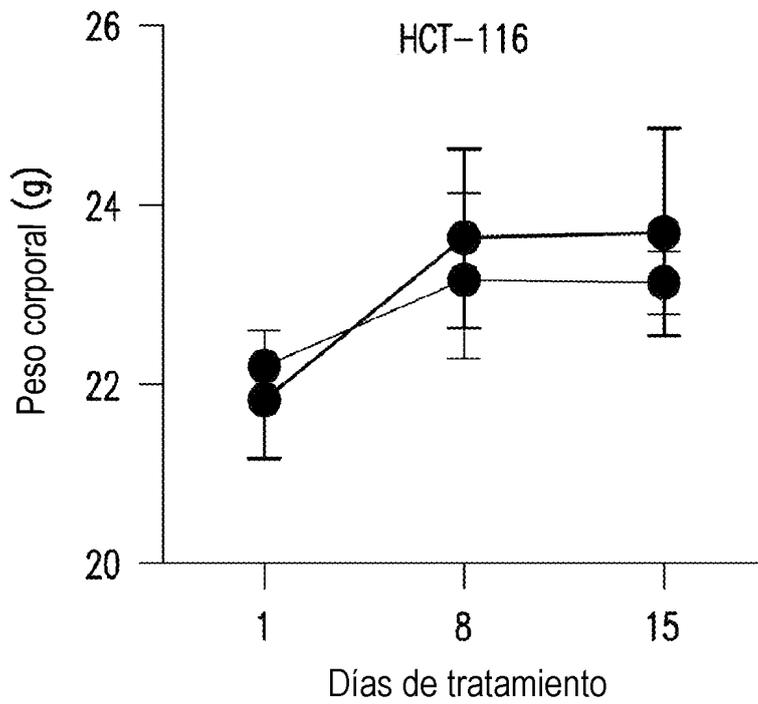


FIG. 11 J

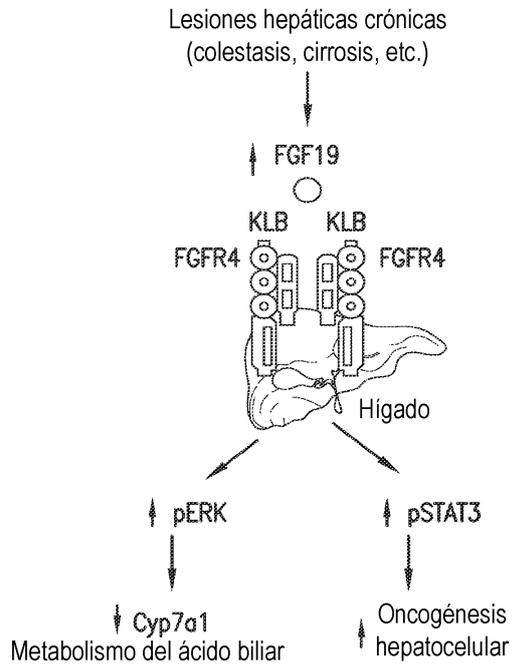


FIG. 12A

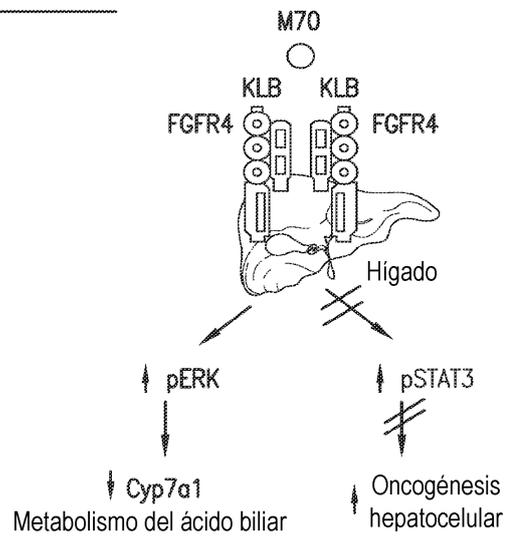


FIG. 12B

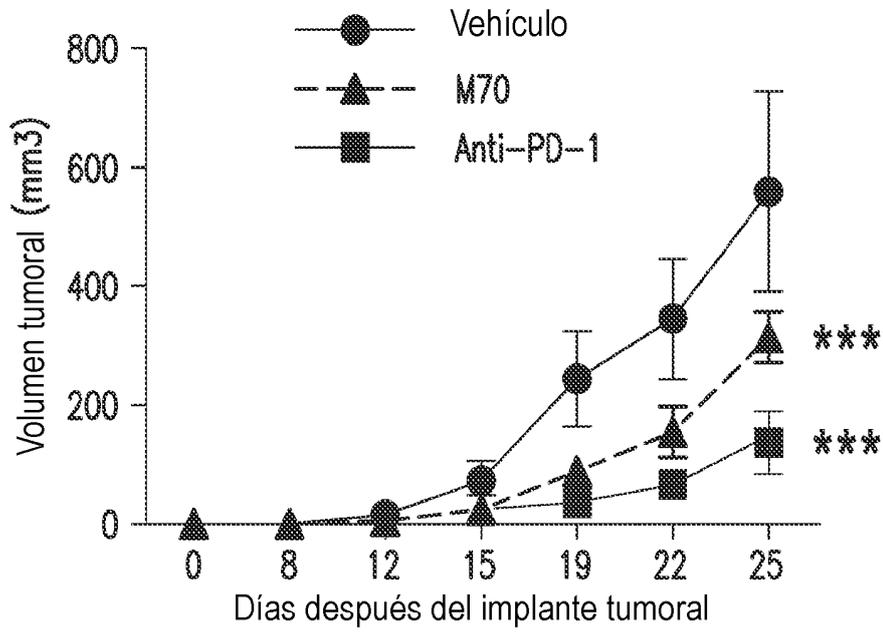


FIG. 13A

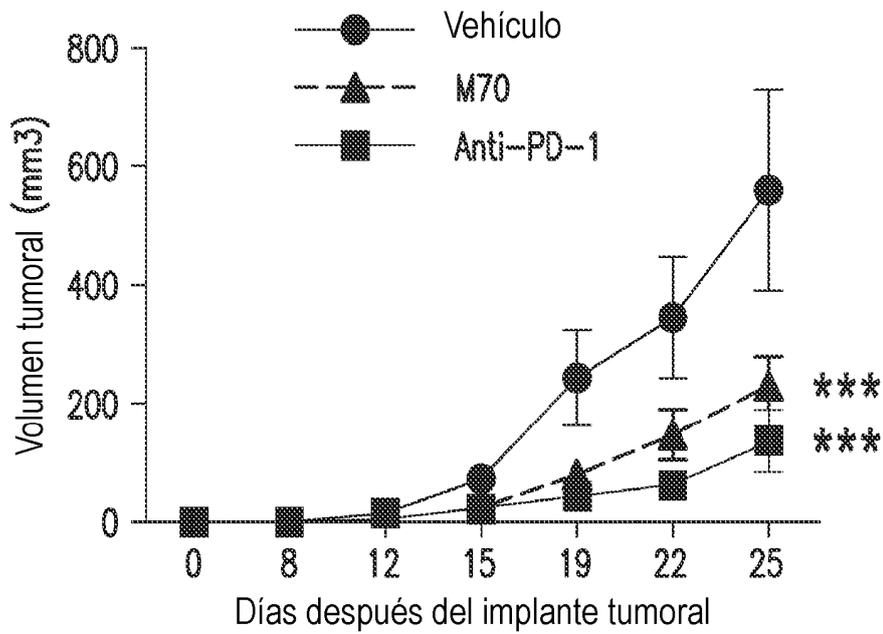


FIG. 13B

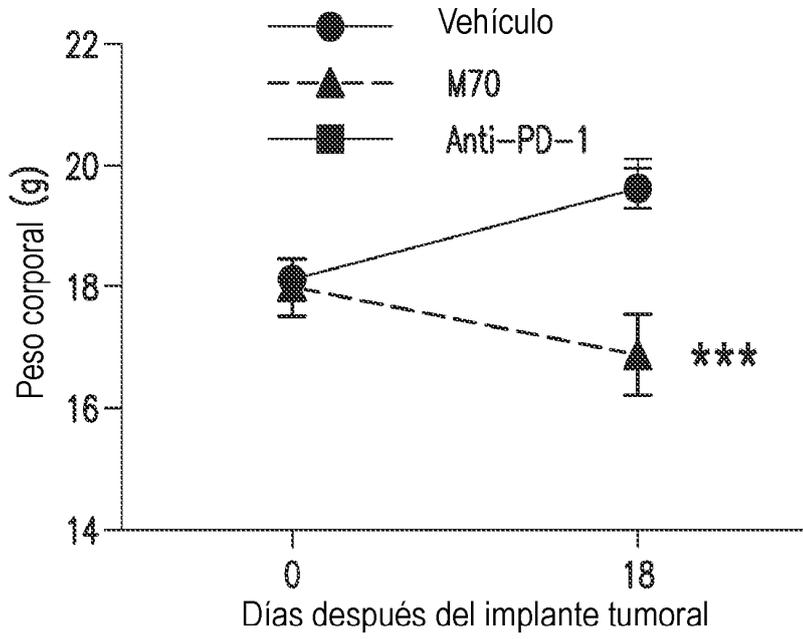


FIG. 14A

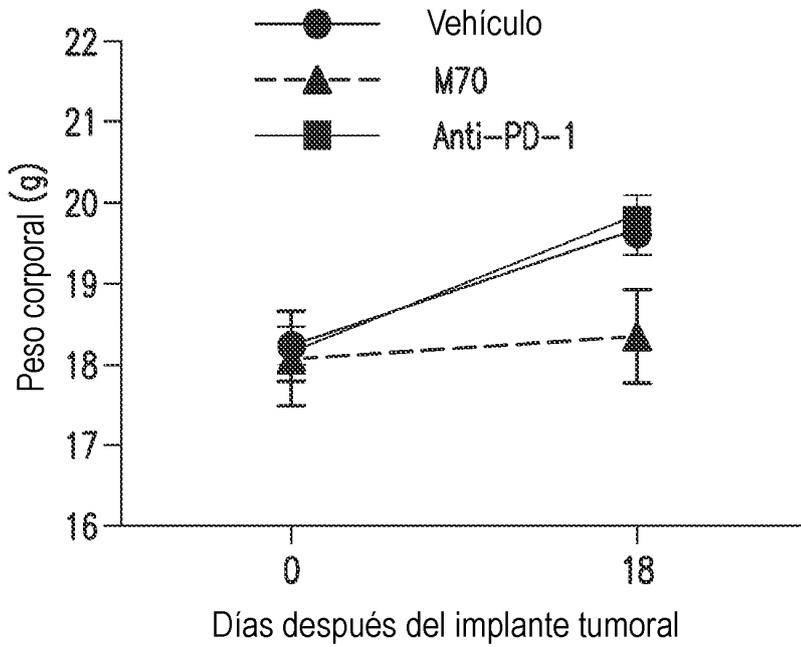


FIG. 14B