



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 100**

51 Int. Cl.:

C07K 14/50 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05742237 .0**

96 Fecha de presentación : **02.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1751184**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Proteínas de fusión del FGF-21.**

30 Prioridad: **13.05.2004 US 570908 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.01.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.01.2010

73 Titular/es: **ELI LILLY AND COMPANY**
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285, US

72 Inventor/es: **Glaesner, Wolfgang;**
Millican, Rohn, Lee, Junior;
Tian, Yu y
Tschang, Sheng-Hung, Rainbow

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 332 100 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión del FGF-21.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos del factor de crecimiento de fibroblastos 21 condensados con proteínas que tienen el efecto de extender la semivida *in vivo* de los polipéptidos. Estas proteínas de fusión se pueden usar para tratar la diabetes mellitus no dependiente de insulina, la obesidad y el síndrome metabólico.

10 **Antecedentes de la invención**

Los factores de crecimiento de fibroblastos son polipéptidos de tamaño grande que se expresan ampliamente en el desarrollo en tejidos adultos (Baird y col., Cancer Cells, 3: 239-243, 1991) y desempeñan papeles cruciales en múltiples funciones fisiológicas, incluidas la angiogénesis, la mitogénesis, la formación del patrón, la diferenciación celular, la regulación metabólica y la reparación de lesiones tisulares (McKeehan y col., Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 59:135-176, 1998). De acuerdo con la bibliografía, la familia de FGF consta ahora de veintidós miembros (Reuss y col., Cell Tissue Res. 313:39-157 (2003)).

Se ha comunicado que el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) se expresa, preferentemente, en el hígado y se describe como un tratamiento para la enfermedad vascular isquémica, la cicatrización de heridas y las enfermedades asociadas con la pérdida de función de las células pulmonares, bronquiales o alveolares y otros numerosos trastornos (Nishimura y col., Biochimica et Biophysica Acta, 1492: 203-206) (2000); documentos US 6.716.626 y WO01/18172). Más recientemente, se ha demostrado que el FGF-21 estimula la captación de glucosa en adipocitos de ratón 3T3-L1 en presencia o ausencia de insulina, y que disminuye los niveles de glucosa en sangre, en ayunas y sin ayunar, en ratones *ob/ob* y *db/db* y ratas ZDF de 8 semanas de edad de un modo dependiente de la dosis, lo que proporciona la base para el uso de FGF-21 como terapia para tratar la diabetes de tipo 2 y la obesidad (documento WO03/011213).

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la fusión de una proteína con una semivida en circulación prolongada, tal como la porción Fc de una inmunoglobulina o albúmina, a un compuesto de FGF-21 tiene como resultado una proteína de fusión de FGF-21 biológicamente activa con una semivida de eliminación ampliada y menor aclaramiento cuando se compara con el del FGF-21 nativo.

Las proteínas de fusión del FGF-21 de la presente invención tienen mayor utilidad como agente terapéutico, así como mayor comodidad de uso que el FGF-21 salvaje porque conservan toda o una porción de la actividad biológica del FGF-21 salvaje, aunque tienen un tiempo de acción prolongado en comparación con el del FGF-21 salvaje.

Por tanto, las proteínas de fusión de FGF-21 de la presente invención son útiles para tratar sujetos con trastornos, incluidos, entre otros, diabetes de tipo 2, obesidad y síndrome metabólico, siendo ventajas concretas que las proteínas de fusión del FGF-21 de la presente invención tienen mejor eficacia debido a la constante exposición y requieren menos dosis, lo que aumenta la comodidad para un sujeto que necesite tal terapia y la probabilidad del cumplimiento terapéutico de un sujeto con requisitos de dosificación.

El documento 01/72957 desvela nuevos polipéptidos similares al FGF y moléculas de ácido nucleico que los codifican. Estos polipéptidos pueden condensarse con una segunda proteína plasmática.

El documento WO 02/46227 desvela compuestos 1 similares al glucagón condensados con proteínas que tienen el efecto de extender la semivida *in vivo* de los péptidos.

50 **Sumario de la invención**

De acuerdo con la presente invención se proporciona una proteína de fusión heteróloga que comprende un primer polipéptido con un extremo N y un extremo C condensados con un segundo polipéptido con un extremo N y un extremo C, en la que el primer polipéptido es un compuesto de FGF-21 y un segundo polipéptido comprende la secuencia de SEC ID N° 4:

Ala-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Xaa₁₁-Cys-Pro-Ala-Pro-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Phe-Xaa₃₀-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-

Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-
 Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-
 5 Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-
 Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-
 10 Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-
 Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-
 15 Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-
 Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-
 20 Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-
 Leu-Ser-Leu-Gly-Xaa₂₃₀ (SEQ ID NO:4)

en la que:

Xaa en la posición 11 es Pro;

Xaa en la posición 16 es Pro o Glu;

Xaa en la posición 17 es Phe, Val, o Ala;

Xaa en la posición 18 es Leu, Glu, o Ala;

Xaa en la posición 80 es Asn o Ala; y

Xaa en la posición 230 es Lys o está ausente,

y en la que

(i) el extremo C del primer polipéptido está condensado con el extremo N del segundo polipéptido,

o (ii) en el que el extremo N del primer polipéptido está condensado con el extremo C del segundo péptido a través de un ligante seleccionado de:

a) un péptido ligante seleccionado de SEC ID N°: 6, SEc ID N°: 8 o SEC ID N°: 9; b) un péptido rico en glicinas; c) un péptido que tiene la secuencia [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n en la que n es 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Preferentemente, la proteína de fusión heteróloga de la presente invención se selecciona de: L118C/A134C/S167A-1LIgG4 S228P; L118C/A134C/S167A-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A; L118C/A134C/S167A-IL-IgG4 S228P, N297A; L118C/A134C/S167A -1L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; L118C/A134C/S167A-1,5L-IgG4 S228P; L118C/A134C/S167A-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A; L118C/A134C/S167A-1,5L-IgG4 S228P, N297A; L118C/A134C/S167A-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 S228P; L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A; L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 S228P, N297A; y L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A.

Más preferentemente, la proteína de fusión heteróloga de la presente invención se selecciona de: L118C/A134C-1LIgG4 S228P; L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A; L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, N297A; L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P; L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A; L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, N297A; L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; L118C/A134C-2L-IgG4 S228P; L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A; L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, N297A; y L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A.

Preferentemente, la proteína de fusión heteróloga de la presente invención se selecciona de: I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 S228P; I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A; I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, N297A; I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P; I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A; I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, N297A; I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A;

ES 2 332 100 T3

I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 S228P; I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A; I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, N297A; y I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A.

5 La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican la proteína de fusión heteróloga descrita en la presente memoria descriptiva, los vectores que comprenden estos polinucleótidos y las células huésped transfeccionadas o transformadas con los vectores descritos en la presente memoria descriptiva. También se incluye un procedimiento para producir una proteína de fusión heteróloga, que comprende las etapas de transcribir y traducir un polinucleótido descrito en la presente memoria descriptiva en condiciones en las que la proteína de fusión heteróloga se expresa en cantidades detectables.

10 Otra forma de realización de la presente invención abarca las composiciones farmacéuticas de las proteínas de fusión del FGF-21 y procedimientos para tratar a un paciente que sufra diabetes de tipo 2, obesidad o síndrome metabólico, que comprenda administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión heteróloga descrita en la presente memoria descriptiva.

Descripción detallada de la invención

20 Para los propósitos de la presente invención, tal como se divulga y reivindica en la presente memoria descriptiva, los términos siguientes son como se define a continuación.

El FGF-21 es un polipéptido de 208 aminoácidos que contiene una secuencia líder de 27 aminoácidos. El FG-21 humano tiene una identidad de aminoácidos del ~79% con el FGF-21 de ratón y una identidad de aminoácidos del ~80% con el FGF-21 de rata. El FGF-21 humano o una muteína del mismo es el molde polipeptídico preferido para las proteínas de fusión del FGF-21 de la presente invención, pero se reconoce que un experto en la técnica podría fabricar fácilmente proteínas de fusión basadas en una secuencia polipeptídica alternativa de FGF-21 de mamíferos.

30 Las posiciones de los aminoácidos de la presente invención se determinan a partir del polipéptido de FGF-21 de 181 aminoácidos de tipo salvaje o nativo, humano, maduros como se muestra a continuación (SEC ID N° 1):

1	10	20
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr		
35	30	40
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr		
40	50	60
Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro		
45	70	80
Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly		
50	90	100
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu		
55	110	120
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly		
60	130	140
Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro		
65	150	160
Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val		
70	170	180
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala		
Ser		

La correspondiente secuencia de ADN que codifica el polipéptido de FGF-21 de 181 aminoácidos humano maduro es (Sec ID N°: 2):

CACCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCC
 GGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATGCCAGCAGACAGAAGCCCACC
 TGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGC
 CCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAA
 ATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGG
 GCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGG
 AGCTGCTTCTTGAGGACGGATAACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGG
 CCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGC
 ACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCA
 CTCCTGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCT
 CCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCA
 GCTACGCTTCC

El FGF-21 útil en los procedimientos de la presente invención es, preferentemente, una muteína, análogo o derivado del FGF-21 humano, como se muestra en la SEC ID N° 1, el lo sucesivo denominado en conjunto compuestos de FGF-21. Los compuestos de FGF-21 tienen suficiente homología con el FGF-21 de modo que los compuestos tienen la capacidad de unirse al receptor de FGF-21 e iniciar una vía de transducción de señal, que tiene como resultado la estimulación de la captación de glucosa u otros efectos fisiológicos tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, los compuestos de FGF-21 se pueden analizar para determinar la actividad de captación de glucosa usando un ensayo basado en células como el que se describe en el Ejemplo 1.

Un “sujeto” o “paciente” es un mamífero, preferentemente un ser humano.

La diabetes de tipo 2 (diabetes mellitus no insulina dependiente (DMNID)) se caracteriza por un exceso en la producción de glucosa a pesar de la disponibilidad de insulina y los niveles circulantes de glucosa permanecen excesivamente altos como resultado de un aclaramiento inadecuado de la glucosa.

La intolerancia a la glucosa puede definirse como una sensibilidad excepcional a la glucosa.

La hiperglucemia se define como un exceso de azúcar (glucosa) en sangre.

La hipoglucemia, también denominado niveles bajos de azúcar en sangre, se produce cuando su nivel de glucosa en sangre desciende demasiado como para proporcionar suficiente energía para sus actividades corporales.

La hiperinsulinemia se define como un nivel superior a lo normal de la insulina en sangre.

La resistencia a la insulina se define como un estado en el que una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica por debajo de lo normal.

Síndrome metabólico puede definirse como un grupo de al menos tres de los signos siguientes: grasa abdominal en la mayoría de los varones, una cintura de 101,6 cm o mayor; niveles elevados de azúcar en sangre al menos 110 miligramos por decilitro (mg/dl) después de ayunar; niveles elevados de triglicéridos, al menos 150 mg/dl en el torrente sanguíneo; niveles bajos de HDL, menos de 40 mg/dl; y presión arterial de 130/85 o mayor.

Nativo o salvaje se refiere al polipéptido FGF-21 de 181 aminoácidos humano maduro como se muestra en la SEC ID N°: 1. Con el término “nativo” o “salvaje” se pretende abarcar las variantes alélicas del polipéptido en cuestión.

El término “aminoácido” se usa en la presente memoria descriptiva en su sentido más amplio e incluye aminoácidos naturales así como aminoácidos no naturales, incluidos variantes y derivados de aminoácidos. Un experto en la técnica reconocerá, en vista de esta amplia definición, que la referencia a un aminoácido en la presente memoria descriptiva incluye, por ejemplo, aminoácidos L proteogénicos naturales; aminoácidos D; aminoácidos químicamente modificados tales como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos naturales tales como norleucina, β -alanina, ornitina etc.; y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica como característicos de los aminoácidos. Ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen α -metil aminoácidos (p. ej., (α -metil alanina), D-aminoácidos, aminoácidos similares a la histidina (p. ej., 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina y α -meti-histidina), aminoácidos que tienen un metileno adicional en la cadena lateral (aminoácidos “homo”) y aminoácidos en los que un grupo funcional de ácido carboxílico en la cadena lateral se

sustituye con un grupo de ácido sulfónico (p. ej. ácido cisteico). Preferentemente, no obstante, los compuestos de FGF-21 de la presente invención sólo comprenden aminoácidos naturales, excepto si en la presente memoria descriptiva se proporcione específicamente lo contrario.

En la nomenclatura usada en la presente memoria descriptiva para designar los compuestos de FGF-21, los aminoácidos se identifican usando el código de tres letras o, como alternativa, usando el código estándar de una letra. Las mutaciones se designan con el código de tres letras para el aminoácido original, seguido por el número de aminoácido, seguido por el código de tres letras para el aminoácido de sustitución. Las designaciones numéricas de cada muteína se basan en la SEC ID N° 1. Por ejemplo, una sustitución por leucina en la posición 118 (*es decir*, Leu118 o L118) con cisteína (Cys) se designa como Leu118Cys o L118C. De un modo similar, la sustitución doble por isoleucina en la posición 152 y serina en la posición 163 (Ile152/Ser163) con el aminoácido con carga negativa glutamato (Glu) se designa como Ile152Glu/Ser163Glu o I152E/S163E.

“Potencia *in vitro*”, como se usa en la presente memoria descriptiva, es la medida de la captación de glucosa de una proteína de fusión de FGF-21 en un ensayo basado en células y es una medida de la potencia biológica de un compuesto de FGF-21. La potencia *in vitro* se expresa como la “CE₅₀”, que es la concentración eficaz de compuesto que tiene como resultado el 50% de la actividad en un experimento de respuesta a una única dosis. Para los fines de la presente invención, la potencia *in vitro* se determina usando un ensayo de la captación de glucosa que emplea células 3T3-L1 (Ejemplo 1).

El término “semivida en plasma” se refiere al tiempo en el cual la mitad de las moléculas relevantes circulan en plasma antes de su aclaración. Un término que se usa como alternativa es “semivida de eliminación”. Los términos “acción de tiempo extendido” o “acción de tiempo más prolongado” usado en el contexto de semivida en plasma o semivida de eliminación indica que existe un incremento estadísticamente significativo en la semivida de una proteína de fusión de FGF-21 respecto a la de la molécula de referencia (p. ej., la forma sin fusión del polipéptido o el polipéptido nativo), como se determina en condiciones comparables. Preferentemente, una proteína de fusión de FGF-21 de la presente invención tiene una semivida de eliminación superior o comparable a la del compuesto de FGF-21. La semivida comunicada en la presente memoria descriptiva en el Ejemplo 3 es la semivida de eliminación; es lo que corresponde a la velocidad de eliminación terminal en regresión log-lineal. Los expertos en la técnica apreciarán que la semivida es un parámetro derivado que cambia como función del aclaramiento y del volumen de distribución.

El aclaramiento es la medida de la capacidad del cuerpo para eliminar un fármaco. A medida que el aclaramiento disminuye debido a, por ejemplo, modificaciones en un fármaco, cabría esperar que la semivida aumentara. No obstante, esta relación recíproca sólo es exacta cuando no hay cambios en el volumen de distribución. Una relación aproximada útil entre la semivida terminal log-lineal ($t_{1/2}$), el aclaramiento (C) y el volumen de distribución (V) viene dada por la ecuación: $t_{1/2} \approx 0,693 (V/C)$. El aclaramiento no indica cuánto fármaco se está eliminando sino el volumen de fluido biológico, como sangre o plasma, que tendría que estar completamente libre de fármaco para representar la eliminación. El aclaramiento se expresa en forma de volumen por unidad de tiempo (véase el Ejemplo 3).

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención comprenden un compuesto de FGF-21 condensadas a la porción de Fc de una inmunoglobulina, un análogo de la porción de Fc de una inmunoglobulina, albúmina humana, un análogo de la albúmina humana o un fragmento de la albúmina humana. El extremo C del compuesto de FGF-21 puede condensarse directamente, o condensarse a través del ligante peptídico, al extremo N de una albúmina o proteína Fc. Por el contrario, el extremo N del compuesto de FGF-21 puede condensarse directamente, o condensarse a través del ligante peptídico, al extremo C de una albúmina o proteína Fc. Estas proteínas de fusión heterólogas son biológicamente activas y tienen una mayor semivida en comparación con el FGF-21 nativo.

Una “muteína del FGF-21” humana se define como que comprende FG-21 humano en el que al menos un aminoácido de la proteína salvaje madura se ha sustituido por otro aminoácido. Ejemplos de muteínas de FGF-21 se describen en las solicitudes de patente de EE.UU. 60/528.582, 60/606.805, 60/606.830 y 60/635.882. En general, una muteína posee alguna propiedad modificada, estructural o funcional, de la proteína salvaje. Por ejemplo, la muteína puede haber potenciado o mejorado la estabilidad física en soluciones concentradas (p. ej., agregación mediada menos hidrófoba) mientras que mantiene un perfil de bioactividad favorable. La muteína puede poseer mayor compatibilidad con conservantes farmacéuticos (p. ej., m-cresol, fenol, alcohol bencílico), lo que permite la preparación de una formulación farmacéutica conservada que mantiene las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica de la proteína durante el almacenamiento. La muteína puede tener una menor O-glicosilación cuando se expresa en levaduras. La muteína puede tener menos desamidación cuando se compara con el FGF-21 salvaje. Como se usa en la presente memoria descriptiva, estos términos no son limitantes, siendo completamente posible que una muteína dada tenga una o más propiedades modificadas de la proteína salvaje.

Ejemplos de muteínas de FGF-21 con estabilidad farmacéutica potenciada incluyen la sustitución con un aminoácido cargado y/o polar pero sin carga por uno o más de los siguientes: glicina 42, glutamina 54, arginina 77, alanina 81, leucina 86, fenilalanina 88, lisina 122, histidina 125, arginina 126, prolina 130, arginina 131, leucina 139, alanina 145, leucina 146, isoleucina 152, alanina 154, glutamina 156, glicina 161, serina 163, glicina 170 o serina 172, en las que la numeración de los aminoácidos se basa en la SEC ID N° 1. Un aminoácido cargado se define como un aminoácido con carga positiva o negativa. Un aminoácido con carga positiva se define como aquel que incluye histidina, lisina, arginina y análogos no naturales de los mismos (p. ej. ácido gamma aminobutírico, ornitina etc.). Una aminoácido con carga negativa se define como aquel que incluye aspartato, glutamato y análogos no naturales de los mismos (p. ej.,

ácido aminoadéptico). Un aminoácido polar pero sin carga se define como aquel que incluye serina, treonina, asparagina, glutamina y análogos no naturales de los mismos. Muteínas preferidas son Gln54Glu, Leu139Glu, Ala145Glu, Leu146Glu, Ile152Glu, Gln156Glu, Ser163Glu y Ile152Glu-Ser163Glu

5 Muteínas adicionales del FGF-21 con una estabilidad farmacéutica potenciada incluyen FGF-21 con la sustitución de una cisteína por dos o más de los siguientes: arginina 19, tirosina 20, leucina 21, tirosina 22, treonina 23, aspartato 24, aspartato 25, alanina 26, glutamina 27, glutamina 28, alanina 31, leucina 33, isoleucina 35, leucina 37, valina 41, glicina 42, glicina 43, glutamato 50, glutamina 54, leucina 58, valina 62, leucina 66, glicina 67, lisina 69, arginina 72, fenilalanina 73, glutamina 76, arginina 77, aspartato 79, glicina 80, alanina 81, leucina 82, glicina 84, serina 85, 10 prolina 90, alanina 92, serina 94, fenilalanina 95, leucina 100, aspartato 102, tirosina 104, tirosina 107, serina 109, glutamato 110, prolina 115, histidina 117, leucina 118, prolina 119, asparagina 121, lisina 122, serina 123, prolina 124, histidina 125, arginina 126, aspartato 127, alanina 129, prolina 130, glicina 132, alanina 134, arginina 135, leucina 137, prolina 138, o leucina 139, en la que la numeración de los aminoácidos se basa en la SEC ID N°1.

15 Muteínas específicas del FGF-21 con puentes disulfuro introducidos mediante ingeniería, además del natural en Cys75-Cys93, son las siguientes: Gln76Cys-Ser109Cys, Cys75-Ser85Cys, Cys75-Ala92Cys, Phe73Cys-Cys93, Ser123Cys-His125-Cys, Asp102Cys-Tyr104Cys, Asp127Cys-Gly132Cys, Ser94Cys-Glu110Cys, Pro115Cys-His 117Cys, Asn121Cys-Asp127Cys, Leu100Cys-Asp102Cys, Phe95Cys-Tyr107Cys, Arg19Cys-Pro138Cys, Tyr20Cys-Leu139Cys, Tyr22Cys-Leu137Cys, Arg77Cys-Asp79Cys, Pro90Cys-Ala92Cys, Glu50Cys-Lys69Cys, Thr23Cys-Asp 20 25Cys, Ala31Cys-Gly43Cys, Gln28Cys-Gly43Cys, Thr23Cys-Gln28Cys, Val41Cys-Leu82Cys, Leu58Cys-Val62Cys, Gln54Cys-Leu66Cys, Ile35Cys-Gly67Cys, Gly67Cys-Arg72Cys, Ile35Cys-Gly84Cys, Arg72Cys-Gly84Cys, o Arg77 Cys-Ala81Cys, en las que la numeración de los aminoácidos se basan en la SEC ID N°1. Muteínas preferidas con puentes disulfuro introducidos mediante ingeniería son Tyr22Cys-Leu139Cys; Asp24Cys-Arg135Cys; Leu118Cys-Gly132Cys; His117Cys-Pro130Cys; His117Cys-Ala129Cys; Leu82Cys-Pro119Cys; Gly80Cys-Ala129Cys; Gly43 25 Cys-Pro124Cys; Gly42Cys-Arg126Cys; Gly42Cys-Pro124Cys; Gln28Cys-Pro124Cys; Gln27Cys-Ser123Cys; Ala26 Cys-Lys122Cys; o Asp25Cys-Lys122Cys. Muteínas más preferida con puentes disulfuro introducidos mediante ingeniería son Leu118Cys-Ala134Cys; Leu21Cys-Leu33Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; Leu21Cys-Leu33Cys/Leu118Cys-Ala134Cys; Ile152Glu-Ser163Glu/Leu118Cys-Ala134Cys; y Leu118Cys-Ala134Cys/Ser167Ala.

30 Ejemplos de muteínas de FGF-21 humano, o un péptido del mismo biológicamente activo, con menor capacidad de O-Glicosilación cuando se expresan en levaduras en comparación con el FGF-21 humano salvaje incluyen la sustitución de cualquier aminoácido, excepto Ser o Thr por Ser 167, en combinación con la sustitución de una cisteína por dos o más de los siguientes: arginina 19, tirosina 20, leucina 21, tirosina 22, treonina 23, aspartato 24, aspartato 25, alanina 26, glutamina 27, glutamina 28, alanina 31, leucina 33, isoleucina 35, leucina 37, valina 41, glicina 42, glicina 35 43, glutamato 50, glutamina 54, leucina 58, valina 62, leucina 66, glicina 67, lisina 69, arginina 72, fenilalanina 73, glutamina 76, arginina 77, aspartato 79, glicina 80, alanina 81, leucina 82, glicina 84, serina 85, prolina 90, alanina 92, serina 94, fenilalanina 95, leucina 100, aspartato 102, tirosina 104, tirosina 107, serina 109, glutamato 110, prolina 115, histidina 117, leucina 118, prolina 119, asparagina 121, lisina 122, serina 123, prolina 124, histidina 125, arginina 126, aspartato 127, alanina 129, prolina 130, glicina 132, alanina 134, arginina 135, leucina 137, prolina 138, o leucina 40 139, en la que la numeración de los aminoácidos se basa en la SEC ID N°1. Las muteínas más preferidas con menor capacidad de O-glicosilación cuando se expresan en levaduras en comparación con el FGF-21 humano son Leu118Cys-Ala134Cys-Ser167Ala; Leu21Cys-Leu33Cys-Ser167Ala; Ala26Cys-Ser167Ala; o Leu21Cys-Leu33Cys/Leu118Cys-Ala134Cys-Ser167Ala.

45 Un compuesto de FGF-21 también incluye un “derivado de FGF-21”, que se define como una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de FGF-21 o un análogo de FGF-21, pero que además tiene una modificación química de uno o más de sus grupos laterales aminoacídicos, átomos de α -carbono, grupo amino terminal o grupo terminal de ácido carboxílico. Una modificación química incluye, entre otros, añadir restos químicos, creando enlaces nuevos y eliminando restos químicos.

50 Entre las modificaciones en los grupos laterales de aminoácidos se incluyen, sin limitaciones, acilación de grupos lisina ϵ -amino, N-alquilación de arginina, histidina o lisina, alquilación de grupos de ácido carboxílico glutámico o aspártico y desamidación de glutamina o asparagina. Las modificaciones del grupo amino terminal incluyen, sin limitaciones, las modificaciones desamino, N-alquilo menor, N-dialquilo menor y N-acilo. Entre las modificaciones 55 del grupo carboxi terminal se incluyen, sin limitaciones, las modificaciones amida, alquilamida menor, dialquilamida o éster de alquilo menor. Además, uno o más grupos laterales o grupos terminales pueden protegerse con grupos protectores conocidos para el químico experto en proteínas. El α -carbono de un aminoácido puede estar mono o dimetilado.

60 Las proteínas de fusión de FGF-21 de la presente invención tienen una actividad biológica *in vitro* que es comparable a la del FGF-21 nativo. Aunque algunas de las proteínas de fusión de FGF-21 de la invención pueden tener actividad biológica menor que la del FGF-21 nativo medido en un ensayo concreto, esta disminución de actividad se compensa con la extendida semivida del compuesto y/o el menor valor de aclaramiento, y puede incluso ser una característica favorable para un compuesto de FGF-21 con una semivida de eliminación extendida.

65 Las proteínas de fusión de FGF-21 de la presente invención pueden comprender sitios de glicosilación. La glicosilación es una modificación química en la que se añaden restos de azúcar a la proteína en sitios específicos. La glicosilación de proteínas desempeña un papel en asegurar la carga correcta, confirmación y estabilidad de la proteína

5 en maduración y puede dirigir la proteína hacia la superficie de la célula y la secreción eventual de la proteína. Más importante es el hecho de que la glicosilación afecta a la velocidad de aclaramiento *in vivo* de muchas proteínas. Los azúcares pueden unirse a través de un O o de un N. Generalmente, los azúcares unidos con O se añaden al oxígeno del grupo hidroxilo de serina y treonina, mientras que los azúcares unidos con N se añaden al nitrógeno amida de asparagina. El sitio consenso para la N-glicosilación es Asn X1 X2 en la que X1 es cualquier aminoácido a excepción de Pro y X2 es Ser o Thr.

10 *Proteínas de fusión Fc heterólogas*

Los compuestos de FGF-21 descritos en lo que antecede se pueden condensar directamente o a través de un ligante peptídico a la porción Fc de una inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas son moléculas que contienen cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, que normalmente tienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. En cada cadena, un dominio (V) tiene una secuencia aminoacídica variable dependiendo de la especificidad de anticuerpos de la molécula. Los otros dominios (C) tienen una secuencia bastante constante común a moléculas de la misma clase.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la porción Fc de una inmunoglobulina tiene el significado proporcionado habitualmente al término en el campo de la inmunología. Específicamente, este término se refiere a un fragmento de anticuerpo que se obtiene eliminando las dos regiones de unión a antígeno (los fragmentos Fab) del anticuerpo. Un modo de eliminar los fragmentos Fab es digerir la inmunoglobulina con la proteasa papaína. Por tanto, la porción Fc está formada por fragmentos de aproximadamente el mismo tamaño de la región constante procedente de ambas cadenas pesadas, que se asocian mediante interacciones no covalentes y puentes disulfuro. La porción Fc puede incluir las regiones bisagra y extenderse a través de los dominios CH2 y CH3 hasta el extremo C del anticuerpo. Regiones bisagra representativas de inmunoglobulinas humanas y de ratón se pueden encontrar en Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck, C.A.K., ed., W.H. Freeman y Co., 1992. La porción Fc puede además incluir uno o más sitios de glicosilación. La secuencia de aminoácidos de una proteína Fc representativa que contiene una región bisagra, dominios CH2 y CH3, y un sitio de glicosilación en la posición 82 se muestra a continuación:

30 Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 Pro Ala Pro Glu Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 35 Lys Pro Lys Asp Thr Lys Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 40 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 45 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 50 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 55 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 60 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 65 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys [SEQ ID NO: 3]

Hay cinco tipos de regiones Fc de inmunoglobulina humana con diferentes propiedades efectoras y farmacocinéticas: IgG, IgA, IgM, IgD y IgE. La IgG es la inmunoglobulina más abundante en suero. La IgG también tiene la semivida más prolongada en suero de las inmunoglobulinas (23 días). Al contrario que otras inmunoglobulinas, la IgG se recircula de forma eficiente tras la unión a un receptor de Fc. Hay cuatro subclases de IgG, G1, G2, G3 y G4, cada una de las cuales tiene diferentes efectos o funciones. Estas funciones efectoras generalmente están mediadas por la interacción con el receptor de Fc (FcγR) o mediante la unión a C1q y la fijación del complemento. La unión a FcγR puede producir citólisis mediada por células dependientes de anticuerpos, mientras que la unión a factores del complemento puede conducir a lisis celular mediada por complemento. Al diseñar las proteínas de fusión de Fc heterólogas en las que la porción Fc se está utilizando únicamente por su capacidad para extender la semivida, es importante minimizar cualquier función efectora. Todas las subclases de IgG son capaces de unirse a los receptores de Fc (CD16, CD32, CD64), siendo G1 y G3 más eficaces que G2 y G4. La región de unión al receptor de Fc de IgG está formado por los residuos localizados en las regiones bisagra y carboxi terminal del dominio CH2.

Dependiendo del efecto que se desea *in vivo*, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener cualquiera de los isotipos descritos en lo que antecede o pueden contener regiones Fc mutadas en las que el complemento y/o las funciones de unión al receptor de Fc se han alterado. Por tanto, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener toda la porción de Fc de una inmunoglobulina, fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina, o análogos de la mismo condensados con un compuesto de FGF-21.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden consistir en proteínas monocatenarias o polipéptidos multicadena. Se pueden producir dos o más proteínas de fusión de Fc de modo que interactúen a través de puentes disulfuro que se forman de modo natural entre las regiones Fc. Estos multímeros pueden ser homogéneos con respecto al compuesto de FGF-21 o pueden contener diferentes compuestos de FGF-21 condensados en el extremo N de la porción Fc de la proteína de fusión.

Con independencia de la estructura final de la proteína de fusión, la región Fc o similar a Fc debe servir para prolongar la semivida plasmática *in vivo* del compuesto de FGF-21 condensado en el extremo C o el extremo N. Además, el compuesto de FGF-21 condensado debe conservar alguna actividad biológica. La actividad biológica puede determinarse mediante procedimientos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. En los ejemplos 1 u 2 se describen ensayos biológicos representativos.

Es preferible que la región Fc usada para las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención derive de una región Fc de IgG1 o IgG4. Es todavía más preferible que las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención contengan una porción Fc que deriva de IgG4 humana, pero comprende una o más sustituciones en comparación con la secuencia humana salvaje. Como se usa en la presente memoria descriptiva, la porción Fc de una inmunoglobulina tiene el significado proporcionado habitualmente al término en el campo de la inmunología. Específicamente, este término se refiere a un fragmento de anticuerpo que no contiene las dos regiones de unión al antígeno (los fragmentos Fab) del anticuerpo. La porción Fc consiste en la región constante de un anticuerpo de ambas cadenas pesadas, que se asocian a través de interacciones no covalentes y puentes disulfuro. La porción Fc puede incluir las regiones bisagra y extenderse a través de los dominios CH2 y CH3 hasta el extremo C del anticuerpo. La porción Fc puede además incluir uno o más sitios de glicosilación.

Por tanto, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención derivan de la región Fc de IgG4 humano por su capacidad reducida para unirse al FcγR y factores del complemento en comparación con los otros subtipos de IgG. La porción Fc de IgG4 humana de una inmunoglobulina condensada con un compuesto de FGF-21 de la presente invención comprende la secuencia SEC ID N° 4.

Ala-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Xaa₁₁-Cys-Pro-Ala-Pro-
Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-
Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-
Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-
Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-
Glu-Glu-Gln-Phe-Xaa₈₀-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-
Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-
Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-
Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-

Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-
 Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-
 Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-
 Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-
 Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-
 Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-
 Leu-Ser-Leu-Gly-Xaa₂₃₀ (SEQ ID NO:4)

en la que:

Xaa en la posición 11 es Pro o Ser;

Xaa en la posición 16 es Pro o Glu;

Xaa en la posición 17 es Phe, Val, o Ala;

Xaa en la posición 18 es Leu, Glu, o Ala;

Xaa en la posición 80 es Asn o Ala; y

Xaa en la posición 230 es Lys o está ausente.

Además, la región Fc de IgG4 que es parte de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención puede contener una o más de las sustituciones siguientes que eliminan el efecto o la función: Sustitución de prolina por serina en el residuo 228; sustitución de prolina por glutamato en el residuo 233; alanina o valina por fenilalanina en el residuo 234; y alanina o glutamato por leucina en el residuo 235 (numeración UE, Kabat, E.A. y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, NIH Publicación nº 91-3242). Estos residuos corresponden a las posiciones 11, 16, 17 y 18 en la Sec ID N° 4, respectivamente. Además, eliminar el sitio de glicosilación unido mediante N en la región Fc de IgG4 mediante la sustitución de Ala por Asn en el residuo 297 (numeración de la UE) que corresponde a la posición 80 de la SEC ID N° 4 es otro modo de asegurar que se elimina el efecto o actividad residuo en el contexto de una proteína de fusión heteróloga.

El residuo de lisina en el extremo C presente en la molécula nativa puede eliminarse en la porción Fc derivada de IGG4 de las proteínas de fusión heterólogas que se tratan en la presente memoria descriptiva (posición 230 de la Sec ID N° 4; la lisina eliminada se denomina des.K). Las proteínas de fusión que se expresan en algunos tipos celulares (tales como células NSO), en los que lisina está codificada por el codón en el extremo C son heterogéneas en cuanto a que una porción de las moléculas tienen lisina como aminoácido en el extremo C y una porción tienen la lisina eliminada. La delección se debe a la acción proteasa durante la expresión en algunos tipos de células de mamífero. Por tanto, para evitar esta heterogeneidad, se prefiere que los constructos de expresión de fusión de Fc carezcan de un aminoácido en el extremo C del codón terminal de FGF para lisina.

Se prefiere que el aminoácido en el extremo C del compuesto de FGF-21 tratado en la presente memoria descriptiva esté condensado con el extremo N de la porción análoga de Fc de IgG4 a través de un ligante rico en glicina (rico en G), designado con una L, en el que el número inmediatamente precedente a la L hace referencia al número de ligantes que separa el compuesto de FGF-21 de la porción Fc. La función y estabilidad *in vivo* de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención se pueden optimizar añadiendo los ligantes de péptido pequeño para prevenir las interacciones de dominios potencialmente indeseados. Además, un ligante rico en G proporciona alguna flexibilidad estructural de modo que el compuesto de FGF-21 pueda interaccionar de forma productiva con el receptor sobre las células diana. No obstante, estos ligantes pueden incrementar de forma significativa el riesgo de que la proteína de fusión sea inmunogénica *in vivo*. Por tanto, se prefiere que la longitud ya no sea necesaria para prevenir las interacciones indeseadas entre dominios y/o optimizar la actividad y/o estabilidad biológicas- Aunque se pueden usar más copias de este ligante en las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención, se prefiere usar una única copia de este ligante para minimizar el riesgo de inmunogenicidad asociada con la administración prolongada y repetida.

El compuesto de FGF-21 y la porción Fc o HSA de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención se condensan juntos, preferentemente, a través de 1, 1,5 o 2 repeticiones del ligante peptídico rico en G. El ligante rico en glicina más preferido se designa 1L y comprende la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser (SEC ID N° 5). Ligantes peptídicos adicionales preferidos incluyen un ligante especificado como 1,5L, Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:6); un ligante especificado como 2L, Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEC ID N° 7); [un ligante especificado como H1, Asp-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Asp-Ala-Ala-Ala-Arg-Glu-Ala-Ala-Ala-Arg-Asp-Ala-Ala-Ala-Lys (SEC ID N° 8); y un ligante especificado como S1, Asn-Val-Asp-His-Lys-Pro-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Arg (SEC ID N° 9).] En algunos casos se pueden utilizar 3, 4, 5 o incluso 6 repeticiones del ligante peptídico rico en G.

En las proteínas de fusión heterólogas que se indican más adelante, IgG4 se refiere a un análogo de la secuencia de Fc de IgG4 humana especificada como SEc ID N° 4. Las sustituciones en la porción Fc de IgG2 de la proteína de fusión heteróloga se indican entre paréntesis. El aminoácido salvaje se especifica con su abreviatura común, seguida por el número de posición en el contexto de toda la secuencia de IgG4 usando el sistema de numeración de la UE, seguido por el aminoácido que se está sustituyendo en la posición especificada por su abreviatura común.

Proteínas de fusión heterólogas de Fc-FGF-21 preferidas de la presente invención incluyen las siguientes proteínas: I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 (S228P, N297A), I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A), I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 (S228P, N297A), I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A), I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 (S228P, N297A), y I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A).

Proteínas de fusión heterólogas de Fc-FGF-21 más preferidas de la presente invención incluyen las siguientes proteínas: L118C/A134C-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), L118C/A134C-1L-IgG4 (S228P, N297A), L118C/A134C-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A), L118C/A134C-1,5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), L118C/A134C-1,5L-IgG4 (S228P, N297A), L118C/A134C-1,5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A), L118C/A134C-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), L118C/A134C-2L-IgG4 (S228P, N297A), y L118C/A134C-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A).

Proteínas de fusión heterólogas de Fc-FGF-21 todavía más preferidas de la presente invención incluyen las proteínas siguientes: L118C/A134C/S167A-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), L118C/A134C/S167A-1L-IgG4 (S228P, N297A), L118C/A134C/S167A-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A), L118C/A134C/S167A-1,5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), L118C/A134C/S167A-1,5L-IgG4 (S228P, N297A), L118C/A134C/S167A-1,5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A), L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 (S228P, N297A) y L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A).

Debe entenderse que las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención incluyen compuestos de FGF-21 que están acoplados a cualquier proteína de albúmina, incluidos fragmentos, análogos y derivados, en la que tal proteína de fusión es biológicamente activa y tiene una semivida en plasma más prolongada que el compuesto de FGF-21 solo. Se conocen o se pueden generar fragmentos, análogos y derivados que tienen semividas más prolongadas o que tienen semividas intermedias con respecto a la de la albúmina humana nativa y el compuesto de FGF-21 de interés.

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención abarcan proteínas que tienen sustituciones conservadoras de aminoácidos en el compuesto de FGF-21 y/o la porción Fc de la proteína de fusión. Una “sustitución conservadora” es la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que tiene la misma carga electrónica neta y aproximadamente el mismo tamaño y forma. Los aminoácidos con cadenas laterales de aminoácidos alifáticos alifáticos o sustituidos tienen aproximadamente el mismo tamaño cuando el número total de carbono y heteroátomos en sus cadenas laterales difiere en no más de aproximadamente cuatro. Tienen aproximadamente la misma forma cuando el número de ramas en sus cadenas laterales difiere en no más de uno. Se considera que los aminoácidos con grupos fenil o fenil sustituidos en sus cadenas laterales tienen aproximadamente el mismo tamaño y forma. Excepto si en la presente memoria descriptiva se proporciona específicamente de otro modo, las sustituciones conservadoras se efectúan, preferentemente, con aminoácidos naturales.

Como se ha indicado en lo que antecede, las sustituciones de aminoácidos en las proteínas de fusión de la presente invención se pueden basar en la similitud relativa de los sustituyentes en la cadena lateral de aminoácidos, tamaño etc. Además, las sustituciones se pueden realizar sobre la base de la propensión a la estructura secundaria. Por ejemplo, un aminoácido helicoidal puede sustituirse con un aminoácido que conserve la estructura helicoidal. Ejemplos de sustituciones que tienen en cuenta varias de las características anteriores con el fin de producir cambios conservadores de aminoácidos que tienen como resultado cambios silentes dentro de los presentes péptidos etc. se pueden seleccionar de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido natural. Los aminoácidos se pueden dividir en los cuatro grupos siguientes: (1) aminoácidos ácidos; (2) aminoácidos básicos; (3) aminoácidos neutros polares; y (4) aminoácidos neutros apolares.

Los compuestos de FGF-21 de la presente invención pueden generarse y/o aislarse por cualquier medio conocido en la técnica. Debido al tamaño de las proteínas de fusión se prefieren procedimientos recombinantes tales como los descritos en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989).

Se pueden emplear varios procedimientos de purificación proteica y tales procedimientos se conocen y se describen en la técnica en, por ejemplo, Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990) y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionadas dependerán de, por ejemplo, la naturaleza del procedimiento de producción usado para el FGF-21.

Las proteínas IgG4 humanas salvajes se pueden obtener de diversas fuentes. Por ejemplo, estas proteínas se pueden obtener de una biblioteca de ADNc preparada a partir de células que expresan el ARNm de interés a un nivel detectable. Las bibliotecas se pueden someter a detección selectiva con sondas diseñadas usando el ADN publicado o la secuencia de proteínas para la proteína de interés concreta. Por ejemplo, las regiones constantes de la cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina se describen en Adams y col. (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Goughet, y col. (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby, y col. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6027-6031; Rice y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7862-7862; Falkner, y col. (1982) *Nature* 298:286-288; y Morrison, y col. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2: 239-256.

La detección selectiva de una biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada puede realizarse usando procedimientos estándar, tales como los descritos en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989). Un medio alternativo para aislar un gen que codifica una proteína inmunoglobulina es usar la metodología PCR [Sambrook y col., ant.; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1995)]. Los cebadores para PCR se pueden diseñar sobre la base de secuencias publicadas.

Generalmente, las secuencias salvajes de longitud completa clonadas a partir de una biblioteca concreta pueden servir como molde para crear los fragmentos análogos de la Fc de IgG4 de la presente invención que conservan la capacidad para conferir una semivida en plasma más larga al compuesto de FGF-21 que es parte de la proteína de fusión.

Los fragmentos análogos de la Fc de IgG4 se pueden generar usando técnicas de PCR con cebadores diseñados para hibridar con las secuencias correspondientes a los extremos diseñados del fragmento. También se pueden diseñar cebadores para PCR para crear sitios para la enzima de restricción para facilitar la clonación en los vectores de expresión.

Después se puede construir el gen codificador de una proteína de fusión ligando el ADN que codifica un compuesto de FGF-21 en el mismo marco con el ADN que codifica las proteínas de Fc de IgG descritas en la presente memoria descriptiva. El ADN que codifica el compuesto de FGF-21 y los fragmentos de Fc de IgG4 puede ser mutado antes de la unión o dentro del contexto de un ADNc codificador de una proteína de fusión completa. En la técnica se conocen bien diversas técnicas de mutagénesis. El gen que codifica el compuesto de FGF-21 y el gen que codifica la proteína análoga de Fc de IgG4 también se pueden unir en el marco a través de un ADN que codifica un péptido ligante rico en G.

Los compuestos de FGF-21 tienen diversas actividades biológicas. El FGF-21 es particularmente prometedor como tratamiento de la diabetes mellitus no insulina dependiente (DMNID, tipo 2), ya que no supone riesgo de hipoglucemia como los actuales tratamientos para la DMNID. El FGF-21 también se contempla como tratamiento de la obesidad y del síndrome metabólico.

También se considera que un uso de las proteínas de fusión de FGF-21 de la presente invención incluye el uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes de tipo 2, la obesidad y el síndrome metabólico. Las proteínas de fusión de FGF-21 se pueden combinar con otras modificaciones conocidas en la técnica para incrementar la semivida del FGF-21 y, de este modo, incrementar la semivida del compuesto todavía más que una proteína de fusión sola o el otro procedimiento de modificación solo.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el “compuesto de FGF-21” también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que se describen en la presente memoria descriptiva. Un compuesto de FGF-21 de esta invención puede poseer grupos funcionales suficientemente ácidos, suficientemente básicos o ambos, y, de acuerdo con esto reaccionar con cualquiera de un número de bases inorgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal.

Las proteínas de fusión de FGF-21 de la presente invención son particularmente adecuadas para administración parenteral, pueden también administrarse por vía oral, mediante administración nasal o mediante inhalación.

La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, administración sistémica tal como inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea o intraperitoneal.

Las proteínas de fusión de FGF-21 pueden administrarse al sujeto junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica para tratar las enfermedades que se han comentado en lo que antecede. La composición farmacéutica puede ser una solución o, si se administra por vía parenteral, una suspensión del FGF-21. Los vehículos farmacéuticos adecuados pueden contener ingredientes inertes que no interaccionan con el péptido o derivado peptídico. Pueden emplearse técnicas de formulación farmacéutica estándar tales como las que se describen en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, PA. Entre los vehículos farmacéuticos adecuados para administración parenteral se incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución

fisiológica salina, solución salina bacteriostática (solución salina que contiene 0,9% mg/ml de alcohol bencílico), solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, Ringer lactato y similares. Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol y manitol.

- 5 Las proteínas de fusión de FGF-21 de la invención pueden formularse para administración de modo que los niveles en plasma sanguíneo se mantienen dentro del intervalo eficaz durante prolongados periodos de tiempo.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una proteína de fusión de FGF-21 es la cantidad que tiene como resultado un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado sin causar efectos secundarios inaceptables cuando se administra a un sujeto. Un “efecto terapéutico deseado” incluye uno o más de los siguientes: 1) una mitigación de el(los) síntoma(s) asociado(s) con la enfermedad o dolencia; 2) un retraso en el inicio de los síntomas asociados con la enfermedad o dolencia; 3) aumento de longevidad en comparación con la ausencia del tratamiento; y 4) mayor calidad de vida en comparación con la ausencia de tratamiento. Por ejemplo, una “cantidad eficaz” de una proteína de fusión de FGF-21 para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 es la cantidad que tendría como resultado un mayor control de la concentración de glucosa en sangre que en ausencia de tratamiento, lo que tiene como resultado un retraso en el inicio de complicaciones diabéticas tales como retinopatía, neuropatía o nefropatía. Una “cantidad eficaz” de una proteína de fusión de FGF-21 para la prevención de la diabetes es la cantidad que retrasaría, en comparación con la ausencia de tratamiento, el inicio de niveles elevados de glucosa en sangre que requieren tratamiento con fármacos anti-hipoglucémicos tales como sulfonilureas, tiazolidinodionas, insulina y/o bisguanidinas. Además, una “cantidad terapéuticamente eficaz” de la proteína de fusión de FGF-21 administrada a un sujeto también dependerá del tipo y gravedad de la enfermedad y de las características del sujeto, tal como estado de salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a los fármacos.

Los expertos en la técnica pueden optimizar fácilmente las dosis farmacéuticamente eficaces y los regímenes de administración para las composiciones terapéuticas, que comprenden una proteína de fusión de FGF-21, según lo determine la buena práctica médica y la afección clínica del paciente individual. Un intervalo de dosis típico para las proteínas de fusión de FGF-21 de la presente invención variará de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal. Preferentemente, la dosis varía de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Más preferentemente, la dosis es de aproximadamente 1-5 mg/kg de peso corporal. La dosis adecuada de una proteína de fusión de FGF-21 administrada tendrá como resultado la disminución de los niveles de glucosa en sangre y el incremento del gasto de energía mediante la utilización más rápida y más eficiente de la glucosa y, por tanto, es útil para tratar la diabetes de tipo 2, la obesidad y el síndrome metabólico. La frecuencia de la dosis se determina con la razón semivida plasmática/aclaramiento de la proteína de fusión de FGF-21. Preferentemente, la administración de la dosis será aproximadamente cada 2 días. Más preferentemente, la administración de la dosis será de aproximadamente dos veces a la semana. Incluso más preferentemente, la administración de la dosis será de aproximadamente una vez a la semana. Más preferentemente, la administración de la dosis será de aproximadamente dos veces al mes.

Habiendo descrito la presente invención con detalle, la misma se entenderá claramente con referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen en la presente con fines ilustrativos únicamente y no se pretende que sean limitantes de la invención.

Preparación 1

45 *Expresión y purificación de una proteína de fusión de FGF-21 en células HEK293EBNA*

Como alternativa, las proteínas de fusión de FGF-21 se producen en un sistema de expresión de células de mamíferos usando células HEK293EBNA (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD). Las proteínas de fusión de FGF-21 se subclonan en el vector de expresión patentado que representa una modificación del pEAK10 disponible comercialmente, entre los sitios de restricción NheI y XbaI en el MCS. La secuencia de ADNc que codifica una proteína de fusión de FGF-21 se condensa INFRAME con la secuencia líder Igκ para potencial la secreción del producto deseado en el medio de cultivo tisular. La expresión está dirigida por el fuerte promotor viral del CMV. Las células HEK293EBNA son transfeccionadas transitoriamente usando un reactivo de transfección estándar tal como Eugene (Roche Diagnostics, Indianapolis IN, EE.UU.) y la cantidad adecuada del plásmido recombinante, bien como una monocapa o como cultivo de suspensión, a la adecuada densidad celular. Las células se incuban a 37°C y 5% de CO₂, en medio sin suero, y las recolecciones se realizan todos los días durante 5 días. Normalmente, el nivel de expresión en el cultivo de suspensión HEK293EBNA es -30 mg/l. La expresión de una proteína de fusión de FGF-21 en células de mamífero da la secuencia natural en el extremo N, HPIP, es decir sin un residuo de metionina en el extremo N.

60 Para purificar una proteína de fusión de FGF-21 de las células HEK293EBNA, el sobrenadante concentrado del cultivo celular se carga en una columna de 5 ml HiTrap rProtein A FF (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) equilibrada en PBS a pH 7,4, y las proteínas eluyen con ácido cítrico 50 mM, a pH 3,3. Las fracciones se neutralizan inmediatamente con Tris y NaOH 0,5M. El grupo de la fracción se concentra con dispositivos de filtro Millipore 30K Amicon ultra centrífugal (UFC903024) y se cargan en una columna 26/60 Superdex 200 (Amersham Bioscience AB, Uppsala, Suecia) equilibrada en PBS, a pH 7,4. Las fracciones se analizan mediante SDS PAGE, se agrupan y se concentran mediante dispositivos de filtro Millipore 30K Amicon ultra centrífugal y filtros esterilizados usando un filtro de 0,22 μm MILLEX-GV (Millipore SLGVR25CS). La concentración final se determina mediante la absorbancia a 280 nm (corregida por dispersión). Para confirmar la proteína se usan MALDI y secuencia del extremo N.

ES 2 332 100 T3

Para purificar una proteína de fusión de HSA FGF-21 de células HEK293EBNA, el sobrenadante concentrado del cultivo celular se carga en una columna autoempaquetada de 20 ml FF Q Sepharose equilibrada en Tris 20 mM, a pH 7,5. La proteína eluye usando un gradiente lineal de NaCl a 0-500 mM, las fracciones adecuadas se agrupan, se añade acetonitrilo con TFA 0,1% hasta una concentración final del 20% y el material se carga en una columna Vydac proteica C4 10x 250 mm (n° cat. 214TP510) equilibrada con TFA 0,1% en agua. La proteína se eluye usando un gradiente lineal de 20 a 50% de acetonitrilo. El grupo de la fracción se concentra con dispositivos de filtro Millipore 30K Amicon ultra centrífuga (UFC903024) y se carga en una columna 26/60 Superdex 200 (Amersham Bioscience AB, Uppsala, Suecia) equilibrada en PBS, a pH 7,4. Las fracciones se analizan mediante SDS PAGE, se agrupan, se concentran y se esterilizan mediante filtración. La concentración final se determina mediante la absorbancia a 280 nm (corregida por dispersión). Para confirmar la proteína se usan MALDI y secuencia del extremo N.

Preparación 2

15 Expresión de una proteína de fusión de FGF-21 en levaduras

Otro sistema más de expresión para la producción de una proteína de fusión de FGF-21 es una levadura, tal como *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica* o *Saccharomyces cerevisiae*. Para la producción en *Pichia pastoris*, un sistema comercialmente disponible (Invitrogen, Carlsbad, CA) usa vectores con los potentes promotores AOX1 (alcohol oxidasa) para dirigir la expresión de alto nivel de proteínas recombinantes. Como alternativa, los vectores que usan el promotor del gen GAP (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) están disponibles para la expresión constitutiva de alto nivel. Los vectores de expresión multicopia de *Pichia* permiten obtener cepas con múltiples copias del gen de interés integrado en el genoma. El incremento del número de copias del gen de interés en una cepa recombinante de *Pichia* puede incrementar los niveles de expresión proteica.

Ejemplo 1

Captación de glucosa en adipocitos de ratón 3T3-L1

Las células 3T3-L1 se obtienen de la Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD). Las células se cultivan en medio de crecimiento (MC) que contiene 10% de suero bovino fetal enriquecido con hierro en medio Eagle modificado de Dulbecco. Para la diferenciación de adipocitos estándar, dos días después de que las células alcanzan la confluencia (denominado día 0), las células se exponen a medio de diferenciación (MD) que contiene 10% de suero bovino fetal, 10 µg/ml de insulina, dexametasona 1 µM e isobutilmetilxantina 0,5 µM durante 48 horas. Después, las células se mantienen en pos-diferenciación que contiene 10% de suero bovino fetal y 10 µg/ml de insulina.

Ensayo de transporte de glucosa- La captación de hexosa, analizado mediante la acumulación de 2-desoxi-D-[¹⁴C] glucosa 0,1 mM se mide del siguiente modo: Los adipocitos 3T3-L1 en placas de 12 pocillos se lavan dos veces con tampón KRP (NaCl 136 mM, KCl 4,7 mM, NaPO₄ 10 mM, CaCl₂ 0,9 mM, MgSO₄ 0,9 mM, pH 7,4) calentado hasta 37°C y que contiene 0,2% de BSA, se incuban en medio de Leibovitz L-15 que contiene 0,2% de BSA durante 2 horas a 37°C a aire ambiente, se lavan dos veces de nuevo con KRP que contiene 0,2% de tampón BSA y se incuban en KRP, 0,2% de tampón BSA en ausencia (únicamente Me₂SO) o presencia de wortmanina durante 30 minutos a 37°C a aire ambiente. A continuación se añade insulina hasta una concentración final de 100 nM durante 15 min y la captación de 2-D-desoxi-D-[¹⁴C]glucosa se mide durante los últimos 4 minutos. La captación inespecífica, medida en presencia de citocalasina B 10 µM, se resta de todos los valores. Las concentraciones proteicas se determinan con el ensayo de ácido bicinonínico de Pierce. La captación se mide de forma rutinaria por triplicado o cuadruplicado para cada experimento.

La potencia *in vitro* (CE₅₀) se compara con la actividad *in vitro* del FGF-21 salvaje. La potencia *in vitro* de las proteínas de fusión de FGF-21 de la presente invención se compara con el FGF-21 salvaje en la Tabla 1. Como se indica en la Tabla 1, las proteínas de fusión de FGF-21 de la presente invención tienen menor potencia *in vitro* hasta varios grados en comparación con el FGF-21 salvaje. No obstante, es probable que la disminución de la potencia *in vitro* se compense con el incremento de la extensión de tiempo (semivida en plasma) de la proteína de fusión de FGF-21.

TABLA 1

Proteína de fusión del FGF-21	Potencia <i>in vitro</i> CE ₅₀ (nM)
Control salvaje	1,1
FGF-21-Fc*	13,3
FGF-21-L-Fc**	124
FGF-21-L-IgG4m-e**	89
FGF-21-L-HSA**	73
HAS-L-FGF-21***	2,2
Fc-L-FGF-21***	7,2
<p>* Extremo C del FGF-21 condensado con el extremo N de la proteína de fusión</p> <p>** Extremo C del FGF-21 condensado con el extremo N de la proteína de fusión a través del péptido ligante (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃.</p> <p>*** Extremo N del FGF-21 condensado con el extremo C de la proteína de fusión a través del péptido ligante (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃.</p>	

Ejemplo 2

Análisis *in vivo* de proteínas de fusión de FGF-21-Fc en el modelo de ratón *Ob/ob*

El modelo de ratón *Ob/ob* es un modelo animal para hiperglucemia, resistencia a insulina y obesidad. Los ratones *ob/ob* macho se usan para monitorizar los niveles plasmáticos de glucosa y de triglicéridos tras tratamiento con proteínas de fusión de FGF-21 en comparación con el FGF-21 solo. Los grupos de prueba de ratones *ob/ob* macho (7 semanas de edad) son: (1) vehículo control sc (NaCl 0,9%, 0,1 ml/ratón) durante siete días; (2) FGF-21, 11 µg/día, administrados mediante infusión continua durante siete días (bombas Alzet 1007D, 100 mcl, 0,5 mcl/h); (3) proteína de fusión de FGF-21-Fc, 2,55 nM, administrados el día 0 únicamente; (4) proteína de fusión de FGF-21-Fc, 1,5 nM, administrados el día 0 únicamente.; (5) proteína de fusión de FGF-21-Fc, 0,5 nM, administrados el día 0 únicamente. La proteína de fusión de FGF-21-Fc se administra *s.c* en 0,1 ml.

Los niveles de glucosa en sangre se miden a diario durante 7 días, 1 hora después de la dosis, usando un protocolo estándar. El tiempo de acción extendido de las proteínas de fusión de FGF-21-Fc está indicado en la Tabla 2, en la que una dosis única el día 0 disminuye los niveles de glucosa en sangre durante 6 días.

TABLA 2

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre en ratones <i>ob/ob</i> (mg/dl)							
	Días de tratamiento							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Veh. Ctl. (s.c.)	280	288	295	253	260	254	296	321
FGF-21 11 µg/día durante 7 días	281	237	168	154	135	129	124	157
FGF-21-Fc* 2,55 nM, sólo el día 0	281	225	181	177	166	198	195	273
FGF-21-Fc* 1,5 nM, sólo el día 0	279	253	221	226	205	246	241	328
	279	232	218	216	234	252	220	304
* Proteínas de fusión de FGF-21-Fc: el extremo C del FGF-21 se condensa con el extremo N de una Fc de IgG4, sin un péptido ligante. .								

En otro experimento, los ratones *ob/ob* macho se usan para monitorizar los niveles de glucosa en plasma tras un tratamiento único con una proteína de fusión de FGF-21 condensada con un péptido ligante en comparación con la infusión continua del FGF-21 solo. Los grupos de prueba de ratones *ob/ob* macho (7 semanas de edad) son: (1) vehículo control (NaCl 0,9%) mediante infusión continua durante siete días (bombas Alzet 1007D, 100 µl, 0,5 µl/h); (2) FGF-21, 3,4 nM mediante infusión continua durante siete días; (3) proteína de fusión FGF-21-L-Fc, 3,4 nM; administrada s.c. en 0,1 ml sólo el día 0; y (4) proteína de fusión Fc-L-FGF-21, 3,4 nM administrada s.c. en 0,1 ml sólo el día 0; (5) proteína de fusión FGF-21-L-HSA, 3,4 nM administrada s.c. en 0,1 ml sólo el día 0. L es el péptido ligante, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃, en las proteínas de fusión anteriores.

A los animales de los grupos (1) y (2) se les administra la dosis mediante infusión continua durante 7 días y a los grupos (3) a (5) se les administra la dosis sólo el día 0. Los niveles de glucosa en sangre se miden a diario durante 7 días, 1 hora después de la dosis, usando un protocolo estándar. El tiempo de acción extendido superior de las proteínas de fusión de FGF-21 se demuestra en la Tabla 3, en la que una dosis única el día 0 disminuye los niveles de glucosa en sangre durante 7 días.

ES 2 332 100 T3

Además, los niveles de triglicéridos en plasma se miden el día 7 del experimento. El tiempo de acción extendido superior de las proteínas de fusión de FGF-21 se demuestra en la Tabla 4, en la que una dosis única el día 0 disminuye los niveles de triglicéridos en plasma durante 7 días.

TABLA 3

Tratamiento	Niveles de glucosa en sangre en ratones <i>ob/ob</i> (mg/dl)*							
	Días de tratamiento							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Veh. Ctl. Infusión continua	280	270	215	200	200	230	250	310
FGF-21 3,4 nM Infusión continua	281	230	175	130	135	140	130	155
FGF-21-L- Fc* 3,4 nM,	279	210	180	140	135	140	150	200
Fc-L-FGF- 21** 1,5 nM,	279	240	225	165	167	205	230	228
FGF-21-L- HSA+ 2,55 nM,	281	235	170	130	155	185	215	250
* Extremo C del FGF-21 C condensado al extremo N de una Fc de IgG4 ** Extremo C de una Fc de IgG4 condensado al extremo N de FGF-21 + Extremo C del FGF-21 condensado al extremo N de HSA								

TABLA 4

Grupo de prueba	Niveles de triglicéridos en plasma el día 7 (mmol/l)
Vehículo control	640
FGF-21 Control, 3,4 nM	280
FGF-21-L-Fc*	400
Fc-L-FGF-21**	490
FGF-21-L-HSA*	380
<p>* Extremo C del FGF-21 condensado con el extremo N de la proteína de fusión a través de un péptido ligante, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃</p> <p>** Extremo N del FGF-21 condensado con el extremo C de la proteína de fusión a través del péptido ligante (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃.</p>	

Ejemplo 3

Análisis farmacocinético de las proteínas de fusión FGF-21

Las proteínas de fusión de FGF-21 se administran a ratones CD-1 por vías intravenosa (IV) o subcutánea (SC) a una dosis de 0,4 mg/kg. Se extrae sangre de los animales a varios tiempos entre 0 y 336 horas después de la administración de la dosis. El plasma se recoge de cada muestra y se analiza mediante radioinmunoensayo. Los parámetros farmacocinéticos se calculan usando procedimientos dependientes (datos IV) e independientes (datos SC) de modelo (WinNonlin Pro) y se indican en la Tabla 5 más adelante. Mediante administración IV, la proteína de fusión de FGF-21-Fc tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 53,9 horas en comparación con una semivida de eliminación de 0,5 horas para FGF-21 nativo. Mediante administración SC, la proteína de fusión de FGF-21-Fc tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 24 horas en comparación con una semivida de eliminación de 0,6 horas para el FGF-21 nativo. Mediante ambas vías de administración, la proteína de fusión de FGF-21-Fc demuestra un tiempo de acción prolongada cuando se compara con el FGF-21 nativo.

Mediante administración IV, la proteína de fusión de FGF-21-HSA tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 14,3 horas en comparación con una semivida de eliminación de 0,5 horas para FGF-21 nativo. Mediante administración SC, la proteína de fusión de FGF-21-HSA tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 8 horas en comparación con una semivida de eliminación de 0,6 horas para el FGF-21 nativo. Mediante ambas vías de administración, la proteína de fusión de FGF-21-HSA demuestra un tiempo de acción prolongada cuando se compara con el FGF-21 nativo.

TABLA 5

Compuesto	Vía	C _{máx} ^a (ng/ml)	T _{máx} ^b (d)	AUC _{0-∞} ^c (ng/ml)	t _{1/2} ^d (h)	CL/F ^e (ml/h(kg))	% F ^g
	IV	4432	-	137383	53,9	2,9	
FGF-21-Fc	SC	1899	24	145056	48,6	2,8	10 6
FGF-21- HSA	IV	6577		69886	14,3	5,7	
	SC	1380	8	37098	14,5	10,8	-53
FGF-21	IV	4300	-	1200	0,5	803	-
	SC	440	1,0	980	0,6	1024	78
^a Concentración plasmática máxima observada. ^b Tiempo de la concentración plasmática máxima observada. ^c Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo medida desde 0 al infinito ^d Semivida de eliminación en horas. ^e Aclaramiento corporal total como función de la biodisponibilidad. ^g Porcentaje de biodisponibilidad.							

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión heteróloga que comprende un primer polipéptido con un extremo N y un extremo C condensado con un segundo polipéptido con un extremo N y un extremo C, en la que el primer polipéptido es un compuesto de FGF-21 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de SEC ID N° 4:.

Ala-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Xaa₁₁-Cys-Pro-Ala-Pro-
 Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-
 Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-
 Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-
 Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-
 Glu-Glu-Gln-Phe-Xaa₈₀-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-
 Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-
 Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-
 Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-
 Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-
 Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-
 Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-
 Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-
 Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-
 Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-
 Leu-Ser-Leu-Gly-Xaa₂₃₀ (SEQ ID NO:4)

en la que:

- Xaa en la posición 11 es Pro;
 Xaa en la posición 16 es Pro o Glu;
 Xaa en la posición 17 es Phe, Val, o Ala;
 Xaa en la posición 18 es Leu, Glu, o Ala;
 Xaa en la posición 80 es Asn o Ala; y
 Xaa en la posición 230 es Lys o está ausente,

y en la que

- (i) el extremo C del primer polipéptido está condensado con el extremo N del segundo polipéptido a través de un ligante, o
 (ii) en el que el extremo N del primer polipéptido está condensado con el extremo C del segundo péptido a través de un ligante, en el que el ligante en (i) o (ii) se selecciona de:
- a) SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 o SEC ID N° 9;
 b) un péptido rico en glicina.

ES 2 332 100 T3

2. Una proteína de fusión heteróloga de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionada de: FGF21-L118C/A134C/S167A-1L-IgG4 S228P; FGF21-L118C/A134C/S167A-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A; FGF21-L118C/A134C/S167A -1L-IgG4 S228P, N297A; FGF21-L118C/A134C/S167A-1-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; FGF21-L118C/A134C/S167A-1,5LIgG4 S228P; FGF21-L118C/A134C/S167A-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A; FGF21-L118C/A134C/S167A-1,5LIgG4 S228P, N297A; FGF21-L118C/A134C/S167A-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; FGF21-L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 S228P; FGF21-L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A; FGF21-L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 S228P, N297A; y FGF21-L118C/A134C/S167A-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A.

3. Una proteína de fusión heteróloga de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionada de: FGF21-L118C/A134C-1L-IgG4 S228P; FGF21-L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A; FGF21-L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, N297A; FGF21-L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; FGF21-L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P; FGF21-L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A; FGF21-L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, N297A; FGF21-L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; FGF21-L118C/A134C-2L-IgG4 S228P; FGF21-L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A; FGF21-L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, N297A; y FGF21-L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A.

4. Una proteína de fusión heteróloga de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionada de: FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 S228P; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, N297A; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-1L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, F234A, L235A; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-1,5L-IgG4 S228P, N297A; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-1,5LIgG4 S228P, F234A, L235A, N297A; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 S228P; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A; FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, N297A; y FGF21-I152E/S163E/L118C/A134C-2L-IgG4 S228P, F234A, L235A, N297A.

5. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5.

7. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 6.

8. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un paciente que exhibe una o más de obesidad, diabetes de tipo 2 o síndrome metabólico, que comprende los siguientes:

(a) una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y

(b) un transportador farmacéutico aceptable.

9. Una proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar como medicamento.

10. Una proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar en el tratamiento de obesidad, diabetes de tipo 2 o síndrome metabólico.

ES 2 332 100 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly & Company
 5 <120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FGF-21
 <130> x16740
 <150> US 60.570.908
 <151> 2007-05-13
 10 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 15 <211> 181
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 20 <400> 1

 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 25 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 35 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 40 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95
 45 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125
 50 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
 55 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 60 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 165 170 175
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 65 <210> 2
 <211> 543

ES 2 332 100 T3

<212> ADN

<213> *homo sapiens*

5 <400> 2

```

caccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtcg gcagcggtag 60
ctctacacag atgatgccc gcagacagaa gccacactgg agatcagggg ggatgggacg 120
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg 180
ggagttattc aaatcctggg agtcaagaca tccagggttc tgtgccagcg gccagatggg 240
gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt 300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacggcc tcccgtgca cctgccaggg 360
aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctgcttctt gccactacca 420
ggcctgcccc ccgactccc ggagccaccc ggaatcctgg ccccccagcc ccccgatgtg 480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct 540
tcc 543

```

25 <210> 3

<211> 232

<212> PRT

30 <213> *homo sapiens*

<400> 3

```

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

```

55

60

65

ES 2 332 100 T3

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 5 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 10 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 15 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 20 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 25 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 30 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

35 <210> 4
 <211> 230
 <212> PRT
 40 <213> *homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 45 <223> Xaa en la posición 11 = Pro o Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 50 <223> Xaa en la posición 16 = Pro o Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa en la posición 18 = Phe, Val, o Ala;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa en la posición 18 = Leu, Glu o Ala;
 <220>
 65 <221> MISC_FEATURE
 <222> (80)..(80)
 <223> Xaa en la posición 80 = Asn o Ala

ES 2 332 100 T3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (230)..(230)

5 <223> Xaa en la posición 230 = Lys o está ausente,

<400> 4

```

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

      Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
15      20      25      30

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

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

      Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Xaa
25      65      70      75      80

      Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
30      85      90      95

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

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

      Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
40      130      135      140

      Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
45      145      150      155      160

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

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

      Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
55      195      200      205

      Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
60      210      215      220

      Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
      225      230

```

<210> 5

65 <211> 15

<212> PRT

ES 2 332 100 T3

<213> *homo sapiens*

 $\langle 400 \rangle$ 5

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

<210> 6

10 $\langle 211 \rangle$ 22

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

15 $\langle 400 \rangle$ 6

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

20
Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20

 $\langle 210 \rangle$ 7 $^{25}_{\langle 211 \rangle 30}$

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

30 $\langle 400 \rangle$ 7

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

35

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

40 $\langle 210 \rangle$ 8

<211> 25

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

45 $\langle 400 \rangle$ 8

Asp Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Asp Ala Ala Ala Arg Glu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Arg Asp Ala Ala Ala Lys
20 25

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

60 <213> *homo sapiens*

<400> 9

65 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 1 5 10

ES 2 332 100 T3

<210> 10

<211> 585

<212> PRT

5 <213> *homo sapiens*

<400> 10

```

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

```

55

60

65

ES 2 332 100 T3

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 5 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 10 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 15 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 20 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 25 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 30 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 35 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 40 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Asn Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 45 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 50 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

ES 2 332 100 T3

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

5

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

10

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

15

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

20

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

25

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

30

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

35

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

40

45

50

55

60

65