



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 112013033175-5 B1

(22) Data do Depósito: 29/06/2012

(45) Data de Concessão: 25/04/2023

(54) Título: PEPTÍDEO QUIMÉRICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, CÉLULA TRANSFORMADA E USO DO PEPTÍDEO QUIMÉRICO

(51) Int.Cl.: C07K 19/00; C12N 15/62; A61K 38/18; A61P 3/10.

(30) Prioridade Unionista: 01/07/2011 US 61/504,128; 04/08/2011 US 61/515,126.

(73) Titular(es): NGM BIOPHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): LEI LING; DARRIN A. LINDHOUT.

(86) Pedido PCT: PCT US2012045087 de 29/06/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/006486 de 10/01/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/12/2013

(57) Resumo: SEQUÊNCIA DE PEPTÍDEO, SUBSEQUÊNCIA, COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA TRANSFORMADA OU HOSPEDEIRA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA MELHORAR O METABOLISMO DA GLICOSE EM UM INDIVÍDUO E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UMA SEQUÊNCIA PEPTÍDICA A invenção se refere a variantes e fusões do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19), variantes e fusões do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), fusões do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e/ou fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21), e variantes ou fusões do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e/ou fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) de proteínas e sequências peptídicas (peptidornirnéticos) com uma ou mais atividades, tais como atividade de hipoglicemiante, e os métodos e utilização para o tratamento da hiperglicemia e outras desordens.

**PEPTÍDEO QUIMÉRICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, CÉLULA
TRANSFORMADA E USO DO PEPTÍDEO QUIMÉRICO**

Pedidos Relacionados

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do pedido nº 61/504,128, depositado em 1 de julho de 2011 e pedido nº 61/515,126, depositado em 4 de agosto de 2011, ambos os pedidos estão aqui expressamente incorporados por referência na sua totalidade.

Campo da Invenção

[0002] A invenção refere-se a variantes de proteínas do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e sequências de peptídeo (e peptidomiméticos) e fusões do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e/ou proteínas do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) e sequências de peptídeo (e peptidomiméticos), e variantes de fusões do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e/ou proteínas do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) e sequências de peptídeo (e peptidomiméticos) que possuem atividade de redução de glicose e os métodos e usos no tratamento da hiperglicemia e outras desordens.

Introdução

[0003] A diabetes mellitus é uma doença metabólica debilitante causada pela ausência de produção de insulina (tipo 1) ou resistência à insulina ou produção insuficiente de insulina (tipo 2) a partir de células-β pancreáticas. Células-β são células endócrinas especializadas que fabricam e estocam insulina para a liberação após uma refeição. A insulina é um hormônio que facilita a transferência de glicose do sangue

para os tecidos onde é necessária. Pacientes com diabetes devem monitorar frequentemente os níveis de glicose no sangue e muitos requerem diariamente múltiplas injeções de insulina para sobreviver. No entanto, estes doentes raramente atingem os níveis ideais de glicose por injeção de insulina (Turner, R.C. et al. JAMA 281:2005 (1999)). Além disso, a elevação prolongada de níveis de insulina pode resultar em efeitos secundários prejudiciais, tais como o choque hiperglicêmico e dessensibilização da resposta do organismo à insulina. Consequentemente, os pacientes diabéticos ainda desenvolvem complicações de longo prazo, tais como doenças cardiovasculares, doença renal, cegueira, danos nos nervos e desordens de cura de cicatrização (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, Lancet 352:837 (1998)).

[0004] Cirurgia bariátrica tem sido proposta como um potencial tratamento para diabetes. Postulou-se que as alterações na secreção do hormônio do intestino após a cirurgia são responsáveis pela resolução de condições diabéticas. O mecanismo molecular subjacente tem ainda que ser elucidado, embora o peptídeo similar ao glucagon tipo 1 (GLP-1) tenha sido considerado como um possível candidato (Rubino, F. Diabetes Care 32 Suppl 2:S368 (2009)). FGF19 é altamente expresso no intestino delgado distal e sobre expressão transgênica de FGF19 melhora a homeostase da glicose (Tomlinson, E. Endocrinology 143(5):1741-7 (2002)). Os níveis séricos de FGF19 em seres humanos são elevados após a cirurgia gástrica de bypass. Expressão e secreção aumentada de FGF19 poderiam explicar, pelo menos parcialmente, a remissão do diabetes experimentado após a cirurgia.

[0005] Consequentemente, existe uma necessidade de tratamentos alternativos de condições de hiperglicemias tais como a diabetes, pré-diabetes, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose ou síndrome metabólica e outras desordens e doenças associadas com níveis elevados de glicose em seres humanos. A presente invenção satisfaz esta necessidade e proporciona também vantagens relacionadas.

Sumário da Invenção

[0006] A invenção é baseada, em parte, em variantes de sequências de peptídeos do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19), fusões do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e/ou sequências de peptídeos do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) e as variantes de fusões (quimeras) do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e/ou sequências de peptídeos do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) tendo uma ou mais atividades, tais como atividade de redução de glicose. Essas variantes e fusões (quimeras) de sequências de peptídeos FGF19 e/ou FGF21 incluem sequências que não aumentam ou induzem formação de carcinoma hepatocelular (HCC) ou HCC tumorigênese. Tais variantes e fusões (quimeras) de sequências de peptídeos de FGF19 e/ou FGF21 também incluem sequências que não induzem uma elevação substancial ou aumentam em perfil lipídico.

[0007] Em uma forma de realização, uma sequência de peptídeo quimérico inclui ou consiste em: uma região N-terminal tendo pelo menos sete resíduos de aminoácidos, a região N-terminal possuindo uma primeira posição de aminoácido e uma última posição do aminoácido, em que a região N-terminal tem uma

sequência DSSPL ou DASPH, e uma região C-terminal que tem uma porção de FGF19, onde a região C-terminal tem uma primeira posição de aminoácido e uma última posição do aminoácido, em que a região C-terminal inclui os resíduos de aminoácido 16-29 de FGF19 (WGDPIRLRHLYTSG), e em que o resíduo W corresponde à primeira posição de aminoácidos da região C-terminal.

[0008] Em uma outra forma de realização, uma sequência de peptídeo quimérico inclui ou consiste em: uma região N-terminal que tem uma porção de FGF21, onde a região N-terminal tem uma primeira posição de aminoácido e uma última posição do aminoácido, em que a região N-terminal tem uma sequência GQV e, em que o resíduo V corresponde à última posição de aminoácidos da região N-terminal, e uma região C-terminal incluindo uma porção de FGF19, a região C-terminal tendo uma primeira posição de aminoácido e uma última posição do aminoácido, em que a região C-terminal inclui os resíduos de aminoácidos 21 a 29 de FGF19 (RLRHLYTSG), e em que o resíduo R corresponde à primeira posição da região C-terminal.

[0009] Em uma outra forma de realização, uma sequência de peptídeo quimérico inclui ou consiste entre qualquer: uma região N-terminal compreendendo uma porção de SEQ ID NO:100 [FGF21], a região N-terminal que compreende uma primeira posição de aminoácido e uma última posição de aminoácido, em que a região N-terminal compreende, pelo menos, 5 (ou mais) aminoácidos contíguos da SEQ ID NO:100 [FGF21], incluindo os resíduos de aminoácidos GQV, e em que o resíduo V corresponde à última posição de aminoácidos da região N-terminal, e uma região C-terminal que compreende uma porção de SEQ ID NO:99 [FGF19], a região C-terminal que tem uma primeira posição de

aminoácido e uma última posição do aminoácido, em que a região C-terminal compreende resíduos de aminoácidos 21 a 29 de SEQ ID NO:99 [FGF19], RLRHLYTSG, e em que o resíduo R corresponde à primeira posição da região C-terminal. Em determinados aspectos, a região N-terminal compreende pelo menos 6 aminoácidos contíguos (ou mais, por exemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20 a 25, 25 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 75, 75 a 100 aminoácidos contíguos) de SEQ ID NO:100 [FGF21], incluindo os resíduos de aminoácidos GQV.

[0010] Em uma forma de realização adicional, uma sequência de peptídeo inclui ou consiste em qualquer entre: uma sequência variante do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) possuindo uma ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácidos em comparação com uma referência ou tipo selvagem de FGF19; uma sequência variante do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) que tem uma ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácidos em comparação com uma referência ou tipo selvagem de FGF21; uma porção de uma sequência de FGF19 fundida com uma porção de uma sequência de FGF21, ou uma porção de uma sequência de FGF19 fundida com uma porção de uma sequência de FGF21, em que a(s) porção(ões) de sequência FGF19 e/ou de FGF21 tem uma ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácidos em comparação com uma referência ou de tipo selvagem de FGF19 e/ou FGF21.

[0011] Ainda em outras formas de realização, uma sequência de peptídeo ou uma sequência de peptídeo quimérico inclui ou consiste em aminoácidos amino-terminais de 1 a 16 da SEQ ID NO:100 [FGF21] fundidos a aminoácidos carboxi-terminais 21 a

194 de SEQ ID NO:99 [FGF19], ou a sequência do peptídeo tem aminoácidos amino-terminais 1 a 147 de SEQ ID NO:99 [FGF19] fundidos a aminoácidos carboxi-terminais 147 a 181 de SEQ ID NO:100 [FGF21] (M41 (SEQ ID NO: 41)), ou a sequência do peptídeo tem aminoácidos amino-terminais 1 a 20 de SEQ ID NO:99 [FGF19] fundido a aminoácidos carboxi-terminais 17 a 181 de SEQ ID NO:100 [FGF21] (M44 (SEQ ID NO: 44)), ou a sequência do peptídeo tem aminoácidos amino-terminais 1 a 146 de SEQ ID NO:100 [FGF21] fundido a aminoácidos carboxi-terminais 148 a 194 da SEQ ID NO:99 [FGF19] (M45 (SEQ ID NO: 45)), ou a sequência do peptídeo tem aminoácidos amino-terminais 1 a 20 da SEQ ID NO:99 [FGF19] fundido a aminoácidos internos 17 a 146 da SEQ ID NO:100 [FGF21] fundido a aminoácidos carboxi-terminais 148 a 194 da SEQ ID NO:99 [FGF19] (M46 (SEQ ID NO: 46)).

[0012] Ainda em formas de realização adicionais, uma sequência de peptídeo ou uma sequência de peptídeo quimérico tem um padrão de sequência WGDPI correspondente à sequência de aminoácidos WGDPI 16 a 20 de SEQ ID NO:99 [FGF19], ou tem um padrão de sequência WGDPI substituído, mutado ou ausente correspondente à sequência de aminoácidos de FGF19 WGDPI 16 a 20 de FGF19, ou a padrão de sequência WGDPI tem um ou mais aminoácidos substituído, mutado ou ausente, ou é diferente de uma sequência variante de FGF 19 tendo qualquer um GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído por sequência FGF19 WGDPI nos aminoácidos 16 a 20.

[0013] Ainda em outras formas de realização, uma sequência de peptídeo ou uma sequência de peptídeo quimérico tem uma

região N-terminal que inclui ou consiste em resíduos de aminoácidos VHYG, onde a região N-terminal compreende resíduos de aminoácidos DASPHVHYG, ou em que a região N-terminal compreende os resíduos de aminoácidos DSSPLVHYG, ou em que a região N-terminal compreende resíduos de aminoácidos DSSPLLQ, ou em que a região N-terminal compreende resíduos de aminoácidos DSSPLLQFGGQV. Em aspectos particulares, o G corresponde à última posição da região N-terminal, ou o resíduo Q é a última posição de aminoácidos da região N-terminal, ou o resíduo V corresponde à última posição da região N-terminal.

[0014] Ainda em formas de realização adicionais, uma sequência de peptídeo ou uma sequência de peptídeo quimérico tem uma região N-terminal que inclui ou consiste em RHPIP, onde R é a primeira posição de aminoácidos da região N-terminal, ou HPIP (por exemplo, onde HPIP são os 4 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal), em que H é a primeira posição de aminoácidos da região N-terminal, ou RPLAF, onde R é a primeira posição de aminoácidos da região N-terminal, ou PLAF, onde P é a primeira posição de aminoácidos da região N-terminal, ou R, em que R é a primeira posição de aminoácidos da região N-terminal, ou tem na região N-terminal qualquer uma das sequências seguintes: MDSSPL, MSDSSPL, SDSSPL, MSSPL ou SSPL.

[0015] Em outras formas de realização, uma sequência de peptídeo ou uma sequência de peptídeo quimérico tem, na primeira posição da região N-terminal, um resíduo "M", um resíduo "R", um resíduo "S", um resíduo "H", um resíduo "P", um resíduo "L" ou um resíduo "D". Em formas de realização

alternativas, uma sequência de peptídeo ou uma sequência de peptídeo quimérico não tem um resíduo "M" ou um resíduo "R" na primeira posição do aminoácido da região N-terminal.

[0016] Ainda em outras formas de realização, uma sequência de peptídeo ou uma sequência de peptídeo quimérico tem a primeira e a segunda posições da região N-terminal de uma sequência MR, ou na primeira e segunda posições da região N-terminal de uma sequência RM, ou na primeira e segunda posições da região N-terminal de uma sequência RD, ou na primeira e segunda posições da região N-terminal de uma sequência DS, ou na primeira e segunda posições da região N-terminal de uma sequência DM, ou na primeira e segunda posições da região N-terminal de uma sequência MS, ou na primeira e terceira posições da região N-terminal de uma sequência MDS, ou na primeira e terceira posições da região N-terminal de uma sequência RDS, ou na primeira e terceira posições da região N-terminal de uma sequência MSD, ou na primeira e terceira posições da região N-terminal de uma sequência MSS, ou na primeira e terceira posições da região N-terminal de um sequência de DSS, ou na primeira e quarta posições da região N-terminal de uma sequência de RDSS, ou na primeira e quarta posições da região N-terminal de uma sequência de MDSS, ou na primeira e quinta posições região N-terminal uma sequência MRDSS, ou na primeira e quinta posições da região N-terminal de uma sequência de MSSPL, ou na primeira e sexta posições da região N-terminal de uma sequência de MDSSPL, ou na primeira e sétima posições da região N-terminal uma sequência MSDSSPL.

[0017] Ainda em outras formas de realização, uma sequência de peptídeo ou uma sequência de peptídeo quimérico, uma adição de resíduos 30 a 194 de aminoácidos de SEQ ID NO:99 [FGF19] na extremidade C-terminal, resultando num polipeptídeo quimérico tendo na última posição da região C-terminal que corresponde aproximadamente ao resíduo 194 da SEQ ID NO:99 [FGF19]. Em mais outras formas de realização, uma sequência de peptídeo ou sequência de peptídeo quimérico compreende a totalidade ou uma porção de uma sequência de FGF19 (por exemplo, SEQ ID NO:99), posicionado na extremidade C-terminal do peptídeo, ou em que o resíduo "R" amino terminal é excluído do peptídeo.

[0018] Em formas de realização mais particulares, uma sequência de peptídeo ou sequência de peptídeo quimérico inclui ou consiste em qualquer das sequências de peptídeos variante M1 (SEQ ID NO: 1) a M98 (SEQ ID NO: 98), ou uma subsequência ou fragmento de qualquer uma das sequências de peptídeos variante M1 (SEQ ID NO: 1) a M98 (SEQ ID NO: 98).

[0019] Em formas de realização particulares adicionais, a sequência do peptídeo quimérico ou sequência do peptídeo tem uma região N-terminal ou C-terminal de cerca de 20 a cerca de 200 resíduos de aminoácidos de comprimento. Em formas de realização particulares, uma sequência do peptídeo quimérico ou sequência do peptídeo tem pelo menos uma deleção de aminoácido. Em ainda mais formas de realização particulares, uma sequência do peptídeo quimérico ou sequência do peptídeo ou uma subsequência ou seu fragmento tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais deleções de aminoácidos no terminal amino, carboxi-terminal ou internamente. Em um aspecto particular não limitativo, a

substituição ou deleção de aminoácidos é em qualquer das posições dos aminoácidos 8 a 20 de FGF19 (AGPHVHYGWGDPI).

[0020] Em formas de realização mais particulares, uma sequência do peptídeo quimérico ou sequência do peptídeo inclui ou consiste em uma sequência de aminoácidos de cerca de 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100 ou mais aminoácidos. Em mais formas de realização particulares, uma sequência de peptídeo quimérico ou sequência de peptídeo inclui ou consiste em uma sequência de aminoácidos de cerca de 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100 ou mais aminoácidos de FGF19 ou FGF21.

[0021] Em outras formas de realização particulares, as sequências de peptídeos quiméricos e sequências de peptídeos têm funções ou atividades particulares. Em um aspecto, uma sequência de peptídeo quimérico ou sequência de peptídeo mantém ou aumenta uma atividade de FGFR4 mediada. Em aspectos adicionais, uma sequência de peptídeo quimérico ou sequência de peptídeo liga-se ao receptor 4 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR4) ou ativa FGFR4, ou não se liga ao FGFR4 de forma detectável ao receptor 4 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR4) ou ativa FGFR4, ou se liga ao FGFR4 com uma afinidade inferior, comparável ou maior do que a afinidade de ligação do FGF19 com FGFR4, ou ativa FGFR4 a uma extensão ou quantidade menor, comparável ou superior a FGF19 ativa FGFR4. Em outros aspectos, uma sequência de peptídeo quimérico ou sequência de peptídeo reduziu formação de carcinoma hepatocelular (HCC) em comparação com FGF19, ou uma sequência variante FGF 19 tendo qualquer uma das GQV, GDI, WGPI, WGDPV,

WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído pela sequência WGDPI em aminoácidos 16 a 20 de FGF19 e/ou tem maior atividade hipoglicemiante em comparação com FGF19, ou uma sequência variante FGF 19 tendo qualquer uma das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído pela sequência WGDPI em aminoácidos 16 a 20 de FGF19 e/ou tem menos aumento de atividade dos lipídios em comparação com FGF19, ou uma sequência variante FGF 19 tendo qualquer uma das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído pela sequência WGDPI em aminoácidos 16 a 20 de FGF19, e/ou tem menor atividade de aumento de triglicerídeos, colesterol, não-HDL ou HDL em comparação com FGF19, ou uma sequência variante de FGF 19 tendo qualquer uma das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído pela sequência WGDPI em aminoácidos 16 a 20 de FGF19, e/ou tem menor atividade de redução de massa magra em comparação com FGF21. Tais funções e atividades podem ser determinadas *in vitro* ou *in vivo*, por exemplo, em ratos db/db.

[0022] Ainda em formas de realização adicionais, as sequências de peptídeos quiméricos e sequências de peptídeos isolados ou purificados, e/ou sequências de peptídeos quiméricos e sequências de peptídeos podem ser incluídas nas composições. Em uma forma de realização, uma sequência de peptídeo quimérico ou peptídeo sequência está incluída numa composição farmacêutica. Tais composições incluem combinações

de ingredientes inativos ou outros ativos. Em uma forma de realização, uma composição, como uma composição farmacêutica, inclui a sequência do peptídeo quimérico ou uma sequência de peptídeo e um agente redutor de glicose.

[0023] Ainda em outras formas de realização, as moléculas de ácido nucleico que codificam a sequência do peptídeo quimérico ou sequência de peptídeo são fornecidas. Tais moléculas podem incluir ainda um elemento de controle da expressão em ligação operável que confere a expressão da molécula de ácido nucleico que codifica para o peptídeo *in vitro*, de uma célula ou *in vivo*, ou um vetor que compreende a molécula de ácido nucleico (por exemplo, um vetor viral). Células transformadas e hospedeiras que expressam as sequências de peptídeos quiméricos e sequências de peptídeos também são fornecidas.

[0024] Usos e métodos de tratamento que incluem a administração ou liberação de qualquer sequência do peptídeo quimérico ou sequência de peptídeo são também fornecidos. Em formas de realização particulares, um uso ou método de tratamento de um paciente inclui a administração de um peptídeo quimérico inventado ou uma sequência de peptídeo a um paciente, tal como um paciente possuindo, ou em risco de ter, uma doença ou um distúrbio tratável por uma sequência de peptídeo inventado em uma quantidade eficaz para tratar a doença ou desordem. Em uma outra forma de realização, um método inclui a administração de um peptídeo quimérico inventado ou uma sequência de peptídeo a um paciente, tal como um paciente que tem uma condição hiperglicêmica (por exemplo, diabetes, tais como diabetes insulino-dependente (tipo I), diabetes tipo II ou diabetes gestacional), resistência à

insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose ou síndrome metabólica ou é obeso ou tem uma massa corporal indesejável.

[0025] Em determinados aspectos dos métodos e usos, uma sequência de peptídeo quimérico ou sequência de peptídeo é administrada a um paciente numa quantidade eficaz para melhorar o metabolismo da glicose no paciente. Em aspectos mais específicos, um paciente possui um nível de glicose no plasma em jejum superiores a 100 mg/dl ou tem um nível de hemoglobina A1c (HbA1c) acima de 6%antes da administração.

[0026] Em outras formas de realização, o uso ou o método de tratamento de um paciente se destina a ou resulta em níveis reduzidos de glicose, aumento da sensibilidade à insulina, diminuição da resistência à insulina, glucagon reduzida, uma melhoria na tolerância à glicose ou metabolismo da glicose ou homeostase, melhoria função pancreática ou redução de triglicerídeos, colesterol, IDL, LDL e VLDL ou uma diminuição da pressão sanguínea, diminuição do espessamento da camada íntima do vaso sanguíneo ou diminuição da massa corporal ou ganho de peso.

[0027] Os métodos de análise e/ou identificação de uma sequência de peptídeo quimérico ou sequência de peptídeo são também fornecidos, tal como as sequências de peptídeos quiméricos e sequências de peptídeos que têm atividade de redução de glicose sem substancial atividade de carcinoma hepatocelular (HCC). Numa forma de realização, um método compreende: a) fornecimento de uma sequência de peptídeo quimérico candidato ou sequência de peptídeo; b) administração da sequência de peptídeo candidato a um animal de teste (por exemplo, um rato db/db); c) medição dos níveis de glicose do

animal depois da administração da sequência de peptídeo candidato para determinar se a sequência de peptídeo candidato reduz os níveis de glicose. Em um aspecto particular, a sequência do peptídeo quimérico ou sequência de peptídeo também é analisada para a indução de HCC no animal (por exemplo, avaliação de uma amostra de tecido hepático do animal de teste) ou expressão de um marcador correlacionador com atividade HCC, em que um peptídeo candidato tendo atividade redutora de glicose e não atividade HCC substancial. Tais métodos identificam o candidato como tendo atividade de redução de glicose, opcionalmente, também sem atividade substancial de carcinoma hepatocelular (HCC).

Descrição dos Desenhos

[0028] A FIG. 1 mostra sequências de proteína FGF19 e FGF21 e sequências variantes representativas, ou seja, sequências de peptídeo variante M5 (SEQ ID NO: 5), variante M1 (SEQ ID NO: 1), variante M2 (SEQ ID NO: 2), variante M69 (SEQ ID NO: 69), variante M3 (SEQ ID NO: 3), variante M48 (SEQ ID NO: 48), variante M49 (SEQ ID NO: 49), variante M50 (SEQ ID NO: 50), variante M51 (SEQ ID NO: 51), variante M52 (SEQ ID NO: 52), variante M53 (SEQ ID NO: 53) e variante M70 (SEQ ID NO: 70). 3 formas alélicas adicionais (polimórficas) de FGF21, ou seja, M71 (SEQ ID NO: 71), M72 (SEQ ID NO: 72) e M73 (SEQ ID NO: 73) também são mostradas.

[0029] A FIG. 2 mostra as trocas representativas de domínio entre sequências de proteínas FGF21 (sem sombreamento) e FGF19 (sombreamento cinza) e as sequências (quiméricas) fundidas resultantes. As regiões de aminoácidos de cada um dos FGF21 e FGF19 presente na fusão (quimera) são indicadas por números.

Redução de glicose e elevação de lipídeos é mostrada para cada uma das sequências quiméricas.

[0030] A FIG. 3A-3I mostra dados de redução da glicemia e peso corporal. Sequências de peptídeos A) variante M5 (SEQ ID NO: 5); B) variante M1 (SEQ ID NO: 1); C) variante M2 (SEQ ID NO: 2) e variante M69 (SEQ ID NO: 69); D) variante M3 (SEQ ID NO: 3); E) variante M48 (SEQ ID NO: 48) e variante M49 (SEQ ID NO: 49); F) variante M51 (SEQ ID NO: 51) e variante M50 (SEQ ID NO: 50); G) peptídeo variante M52 (SEQ ID NO: 52); H) peptídeo variante M53 (SEQ ID NO: 53) e I) variante M70 (SEQ ID NO: 70) todos tendo redução da glicemia (isto é, atividade antidiabética) em ratos db/db. Os ratos foram injetados com vetor AAV expressando FGF19, FGF21, as variantes selecionadas e solução salina e GFP são controles negativos.

[0031] A FIG. 4A-4I mostra perfil lipídico sérico (triglicerídeos, colesterol total, HDL e não-HDL) de ratos db/db injetados com vetor AAV expressando FGF19, FGF21 ou sequências de peptídeos A) variante M5 (SEQ ID NO: 5); B) variante M1 (SEQ ID NO: 1); C) variante M2 (SEQ ID NO: 2) e variante M69 (SEQ ID NO: 69); D) variante M3 (SEQ ID NO: 3); E) variante M48 (SEQ ID NO: 48) e variante M49 (SEQ ID NO: 49); F) variante M51 (SEQ ID NO: 51) e variante M50 (SEQ ID NO: 50); G) peptídeo variante M52 (SEQ ID NO: 52); H) peptídeo variante M53 (SEQ ID NO: 53), e I) variante M70 (SEQ ID NO: 70). Sequência do peptídeo variante M5 (SEQ ID NO: 5) não aumentou ou elevou os lipídeos em contraste com o FGF19, M1 (SEQ ID NO: 1), M2 (SEQ ID NO: 2) e M69 (SEQ ID NO: 69), que aumentam e elevam os lipídeos. Os níveis séricos de todas as

variantes eram comparáveis. Saline e GFP são controles negativos.

[0032] A FIG. 5A-5I mostra dados relacionados a carcinoma hepatocelular (HCC) para sequências de peptídeos A) variante M5 (SEQ ID NO: 5); B) variante M1 (SEQ ID NO: 1); C) variante M2 (SEQ ID NO: 2) e variante M69 (SEQ ID NO: 69); D) variante M3 (SEQ ID NO: 3); E) variante M48 (SEQ ID NO: 48) e variante M49 (SEQ ID NO: 49); F) variante M51 (SEQ ID NO: 51) e variante M50 (SEQ ID NO: 50); G) variante M52 (SEQ ID NO: 52); H) peptídeo variante M53 (SEQ ID NO: 53), e I) variante M70 (SEQ ID NO: 70). Todas as variantes não aumentaram significativamente ou induziram a formação de carcinoma hepatocelular (HCC) ou HCC tumorigênese em contraste com o FGF19. Pontuação de HCC é registada como o número de nódulos de HCC na superfície de todo o fígado de ratos com variantes injetadas dividido pelo número de nódulos de HCC de ratos injetados com FGF19 de tipo selvagem.

[0033] A FIG. 6A-6I mostra dados de massa magra ou de massa gorda para sequências de peptídeos A) variante M5 (SEQ ID NO: 5); B) variante M1 (SEQ ID NO: 1); C) variante M2 (SEQ ID NO: 2) e variante M69 (SEQ ID NO: 69); D) variante M3 (SEQ ID NO: 3); E) variante M48 (SEQ ID NO: 48) e variante M49 (SEQ ID NO: 49); F) variante M51 (SEQ ID NO: 51) e variante M50 (SEQ ID NO: 50); G) variante M52 (SEQ ID NO: 52); H) peptídeo variante M53 (SEQ ID NO: 53) e I) variante M70 (SEQ ID NO: 70). Exceto para M2 (SEQ ID NO: 2), M5 (SEQ ID NO: 5) e M69 (SEQ ID NO: 69), as sequências de peptídeos variantes reduzem a massa magra ou massa gorda em contraste com o FGF21.

[0034] A FIG. 7A-7B mostra dados gráficos que demonstram que a injeção do polipeptídeos recombinantes A) variante M5 (SEQ ID NO: 5) e B) variante M69 (SEQ ID NO: 69) reduzem a glicose no sangue em ratos *ob/ob*.

[0035] A FIG. 8 mostra dados que indicam que a expressão hepática de família 1 aldo-ceto redutase, membros C18 (Akr1C18) e família 1 carreadora soluto, membros 2 (slc1a2) parece correlacionar-se com a atividade HCC.

Descrição Detalhada

[0036] A presente invenção proporciona sequências quiméricas e de peptídeos que são capazes de diminuir ou reduzir os níveis de glicose. Em uma forma de realização, uma sequência de peptídeo quimérico inclui ou consiste em uma região N-terminal tendo pelo menos sete resíduos de aminoácidos e a região N-terminal que tem uma primeira posição de aminoácido e uma última posição do aminoácido, em que a região N-terminal possui uma sequência DSSPL ou DASPH e uma região C-terminal que tem uma porção de FGF19 e a região C-terminal que tem uma primeira posição de aminoácido e uma última posição do aminoácido, em que a região C-terminal inclui os resíduos de aminoácidos 16 a 29 de FGF19 (WGDPIRLRHLYTSG) e o resíduo W corresponde à primeira posição de aminoácidos da região C-terminal.

[0037] Em uma outra forma de realização, uma sequência de peptídeo quimérico inclui ou consiste em uma região N-terminal que tem uma porção de FGF21 e região N -terminal que tem uma primeira posição de aminoácido e uma última posição do aminoácido, em que a região N-terminal tem uma sequência GQV e o resíduo V corresponde à última posição de aminoácidos da

região N-terminal, e uma região C-terminal que tem uma porção de FGF19 e a região C-terminal que tem uma primeira posição de aminoácido e última posição de aminoácido em que a região C-terminal inclui os resíduos de aminoácidos 21 a 29 de FGF19 (RLRHLYTSG) e o resíduo de R corresponde à primeira posição da região C-terminal.

[0038] Em outras formas de realização, uma sequência de peptídeo inclui ou consiste em uma sequência variante do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) que tem uma ou mais substituições de aminoácidos, inserções ou deleções em comparação com uma referência ou tipo FGF19 selvagem. Em formas de realização adicionais, uma sequência de peptídeo inclui ou consiste em uma sequência variante do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) que tem uma ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácidos em comparação com uma referência ou tipo FGF21 selvagem. Ainda em formas de realização adicionais, uma sequência de peptídeo inclui ou consiste em uma porção de uma sequência de FGF19 fundida com uma porção de uma sequência de FGF21. Ainda em formas de realização adicionais, uma sequência de peptídeo inclui ou consiste em uma porção de uma sequência de FGF19 fundida com uma porção de uma sequência de FGF21, onde a porção de sequência (s) FGF19 e/ou FGF21 tem uma ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácidos em comparação com uma referência ou FGF19 tipo selvagem e/ou FGF21.

[0039] A invenção também proporciona métodos e usos no tratamento de um paciente com ou em risco de ter um distúrbio metabólico tratável usando variantes e fusões de sequências de

peptídeos de fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e/ou fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21). Numa forma de realização, um método inclui o contato ou a administração a um paciente de um ou mais ácidos nucleicos que codifica sequência de peptídeos variantes ou fusão do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e/ou fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) em uma quantidade eficaz para tratar o distúrbio. Numa outra forma de realização, um método inclui contato ou administração a um paciente uma ou mais moléculas de ácido nucleico que codificam para uma sequência de peptídeo variante ou fusão de fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) e/ou fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) (por exemplo, um elemento de controle da expressão em ligação operativa com o ácido nucleico que codifica a sequência do peptídeo, incluindo, opcionalmente, um vetor) em uma quantidade eficaz para tratar o distúrbio.

[0040] Embora a compreensão do mecanismo subjacente de ação dos peptídeos da invenção não é necessária para a prática da invenção, sem estar ligado a qualquer teoria ou hipótese particular, crê-se que os peptídeos da invenção imitam, pelo menos em parte, o efeito que a cirurgia bariátrica tem sobre, por exemplo, a homeostase da glicose e perda de peso. As alterações na secreção de hormônios gastrointestinais (por exemplo, o peptídeo similar ao glucagon tipo 1 (GLP-1)) após cirurgia bariátrica se crê responsável pela resolução de, por exemplo, condições diabéticas. FGF19 é altamente expresso no intestino delgado distal e sobre-expressão transgênica de FGF19 melhora a homeostase da glicose. Como os níveis de FGF19

em humanos também são elevados após a cirurgia de *bypass* gástrico, o FGF19 elevado pode estar envolvido com a remissão de diabetes observada após a cirurgia bariátrica.

[0041] Uma sequência referência representativa ou FGF19 tipo selvagem é apresentada como:

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRI
 RADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEET
 EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
 MFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSFPSFEK (SEQ ID NO:99).

[0042] Uma sequência referência representativa ou tipo selvagem FGF21 é apresentada como:

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTTEAHLEIREDT
 VGGAADQSPESSLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEACSFRELLLED
 GYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSD
 PLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:100). Variantes alélicas FGF21 estão ilustradas na Figura 1 (por exemplo, M70 (SEQ ID NO: 70), M71 (SEQ ID NO: 71) e M72 (SEQ ID NO: 72)).

[0043] Os termos sequências de "peptídeos", "proteína" e "polipeptídeo" são aqui utilizados indiferentemente para se referir a dois ou mais aminoácidos ou "resíduos", incluindo modificações químicas e derivados de aminoácidos, ligados de forma covalente por uma ligação de amida ou equivalente. Os aminoácidos que formam a totalidade ou uma parte de um peptídeo podem ser, de entre os conhecidos 21 aminoácidos que ocorrem naturalmente, os quais são referidos tanto por sua abreviatura de uma só letra ou abreviatura comum de três letras. Nas sequências de peptídeos da invenção, os resíduos de aminoácidos convencionais têm o seu significado

convencional. Assim, "Leu" é a leucina, "Ile" é isoleucina, "Nle" é norleucina, e assim por diante.

[0044] Aqui exemplificados estão sequências de peptídeos, polipeptídeos distintos da referência FGF19 e FGF21 aqui estabelecidos, que reduzem ou baixam glicose, *in vivo* (quadros 1 a 8 e Figura 1). Não limitativos são exemplos particulares de um peptídeo de sequência com os aminoácidos amino-terminal 1 a 16 de FGF21 fundidos à aminoácidos carboxi-terminais 21 a 194 de FGF19; uma sequência de peptídeo com aminoácidos do amino-terminal 1 a 147 de FGF19 fundido com carboxi-terminal de aminoácidos 147 a 181 de FGF21; uma sequência de peptídeo com aminoácidos amino-terminal 1 a 20 de FGF19 fundido com carboxi-terminal de aminoácidos 17 a 181 de FGF21; uma sequência de peptídeo com aminoácidos amino-terminal 1 a 146 de FGF21 fundido com carboxi-terminal de aminoácidos 148 a 194 de FGF19, e uma sequência de peptídeo com os aminoácidos amino-terminal 1 a 20 de FGF19 fundido com os aminoácidos internos 17 a 146 de FGF21 fundidos em carboxi-terminal de aminoácidos 148 a 194 FGF19.

[0045] Sequências particulares de peptídeos adicionais tem um padrão de sequência WGDPI correspondente à sequência de aminoácidos WGDPI 16 a 20 de FGF19, ausência de um padrão de sequência WGDPI correspondente à sequência de aminoácidos WGDPI 16 a 20 de FGF19 ou ter um padrão da sequência substituído (isto é, mutante) WGDPI correspondente à sequência de FGF19 sequência WGDPI de aminoácidos 16 a 20 de FGF19.

[0046] Sequências de peptídeos específicos da invenção também incluem sequências distintas de FGF19 e FGF21 (por exemplo, como aqui estabelecidas), e sequências variantes

FGF19 tendo qualquer uma das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPV, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído por sequência FGF19 WGDPV em aminoácidos 16 a 20. Por conseguinte, o tipo selvagem FGF19 e FGF21 (por exemplo, como aqui estabelecido como SEQ ID NOS:99 e 100, respectivamente) podem ser sequências excluídas e FGF19 com qualquer das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPV, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído pela sequência WGDPV em aminoácidos 16 a 20 de FGF19 também podem ser excluídas. Esta exclusão, no entanto, não se aplica onde uma sequência tenha, por exemplo, três resíduos de FGF21 fundido com FGF19 tendo, por exemplo, quaisquer dos GQV, GQV, GDI ou GPI, ou dois resíduos de FGF21 fundidos com qualquer dos WGPI, WGDI, GDPI, WDPI, WGDI ou WGDP.

[0047] Exemplos não limitativos particulares de sequências de peptídeos incluem ou consistem em toda ou uma parte de uma variante da sequência especificada aqui como M1 a M98 (SEQ ID NOS:1 a 98). Exemplos mais particulares não limitantes de sequências de peptídeos incluem ou consistem em toda ou uma parte de uma sequência apresentada como: HPIPDSPLQFGGQVRLRH LYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGK MQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (Sequências de FGF21 também podem incluir um resíduo "R" no amino-terminal), ou DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAV ALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAV RSPSFEK ou uma subsequência ou seu fragmento, ou RPLAFSDASP

HVHYGWDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSILLEIKAVALRTVAIKG
 VHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKN
 RGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK
 ou uma subsequência ou seu fragmento, ou RPLAFSDSSPLVHYGWDPI
 RLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSILLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMG
 ADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL
 PMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK ou uma
 subsequência ou seu fragmento, ou DSSPLVHYGWDPIRLRHYTSG
 PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSILLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLL
 QYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEE
 PEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK ou uma subsequência
 ou seu fragmento, ou RDSSPLVHYGWDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRAD
 GVVDCARGQSAHSILLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIR
 PDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFS
 SPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M69 (SEQ ID NO: 69)), ou uma
 subsequência ou seu fragmento, ou
 RDSSPLLQWGDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQS
 AHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSE
 KHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMP
 FGLVTGLEAVRSPSFEK (M52 (SEQ ID NO: 52)), ou uma subsequência
 ou seu fragmento, ou
 HPIPDSPLLQFGGQVRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSILLEIKA
 VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLS
 SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEA
 VRSPSFEK (M5 (SEQ ID NO: 5)), ou uma subsequência ou seu
 fragmento, ou
 HPIPDSPLLQFGGQVQRQRYLYTDDAQQTTEAHLEIREDGTGGAADQSPESLLQLKALKPGV
 IQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHSLPLHLPGNKSP
 HRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (M71

(SEQ ID NO: 71)), ou uma subsequência ou seu fragmento, ou HPIPDSPL

QFGQQVRQRQLYTDDAQQTTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSR
FLCQRPDGALYGSILHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPA
RFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (M72 (SEQ ID
NO: 72)), ou uma subsequência ou seu fragmento, ou HPIPDSPLQFGGQVRQRQLYT

DDAQQTTEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS
LHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALP
EPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVVQDELQGVGGEGCHMH PENCKTLLTDIDRTHTEKPVWDGI
TGE (M73 (SEQ ID NO: 73)), ou uma subsequência ou seu fragmento,

RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKA
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGVNVYRSEKHRLPVSL
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA
VRSPSFEK (M1 (SEQ ID NO: 1)), ou uma subsequência ou seu fragmento,

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKA
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGVNVYRSEKHRLPVSL
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA
VRSPSFEK (M2 (SEQ ID NO: 2)), ou uma subsequência ou seu fragmento,

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKA
VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVYRSEKHRLPVSL
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA
VRSPSFEK (M3 (SEQ ID NO: 3)), ou uma subsequência ou seu fragmento,

RDSSPLLQFGGQVRRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVA
IKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGVNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQL

YKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK (M48 (SEQ ID NO: 48)), ou uma subsequência ou seu fragmento, ou

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVA
LRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK (M49 (SEQ ID NO: 49)), ou uma subsequência ou seu fragmento,

RHIPDPDSSPLLQFGDQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK (M50 (SEQ ID NO: 50)), ou uma subsequência ou seu fragmento,

RHIPDPDSSPLLQFGGNVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK (M51 (SEQ ID NO: 51)), ou uma subsequência ou seu fragmento,

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK (M53 (SEQ ID NO: 53)), ou uma subsequência ou seu fragmento, e

MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK (M70 (SEQ ID NO: 70)) ou uma subsequência ou seu fragmento, ou por qualquer uma das sequências de peptídeo que precede o resíduo R terminal pode ser suprimido.

[0048] Exemplos mais particulares não limitantes de sequências de peptídeos incluem ou consistem em:

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHYTS

GPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGL
LQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPE
EPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK, ou uma subsequência ou seu fragmento, ou DSSPLLQFGGQVRLRHYTSGPHG
LSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYS
EEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPED
LRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK, ou uma subsequência ou seu fragmento, ou RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHYTSGPHGLSS
CFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEED
CAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRG
HLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK, ou uma subsequência ou seu fragmento, ou RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHYTSGPHGLSSCFL
RIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAF
EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLE
SDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK, ou uma subsequência ou seu fragmento, ou DSSPLVHYGWGDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ
SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRS
EKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMD
PFGLVTGLEAVRSPSFEK, ou uma subsequência ou seu fragmento.

[0049] Exemplos específicos adicionais não limitativos de sequências de peptídeos, tendo na extremidade N-terminal, uma sequência de peptídeo incluindo ou consistindo da totalidade ou de uma parte de qualquer um dos: HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHYTSG (M5 (SEQ ID NO: 5)); DSSPLLQFGGQVRLRHYTSG (M6 (SEQ ID NO: 6)); RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHYTSG (M7 (SEQ ID NO: 7)); HPIPDSSPLLQWGDPIRLRHYTSG (M8 (SEQ ID NO: 8));

HPIPDSPLQFGWGDPIRLRHLYTSG	(M9)	(SEQ)	ID	NO:	9)) ;
HPIPSSPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG	(M10)	(SEQ)	ID	NO:	10)) ;
RPLAFSDAGPLL QWGDPIRLRHLYTSG	(M11)	(SEQ)	ID	NO:	11)) ;
RPLAFSDAGPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG	(M12)	(SEQ)	ID	NO:	12)) ;
RPLAFSDAGPLLQFGQVRLRHLYTSG	(M13)	(SEQ)	ID	NO:	13)) ;
HPIPSSPHVHYGGQVRLRHLYTSG	(M14)	(SEQ)	ID	NO:	14)) ;
RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHLYTSG	(M15)	(SEQ)	ID	NO:	15)) ;
RPLAFSDAGPHVHWDPI RLRHLYTSG	(M16)	(SEQ)	ID	NO:	16)) ;
RPLAFSDAGPHVGWGDPI RLRHLYTSG	(M17)	(SEQ)	ID	NO:	17)) ;
RPLAFSDAGPHYGWGDPIRLRHLYTSG	(M18)	(SEQ)	ID	NO:	18)) ;
RPLAFSDAGPVYGWGDPIRLRHLYTSG	(M19)	(SEQ)	ID	NO:	19)) ;
RPLAFSDAGPVHGWGDPIRLRHLYTSG	(M20)	(SEQ)	ID	NO:	20)) ;
RPLAFSDAGPVH YWGDPIRLRHLYTSG	(M21)	(SEQ)	ID	NO:	21)) ;
RPLAFSDAGPHVHGWDPIRLRHLYTSG	(M22)	(SEQ)	ID	NO:	22)) ;
RPLAFSDAGPHHGWDPIRLRHLYTSG	(M23)	(SEQ)	ID	NO:	23)) ;
RPLAFSDAGPHHYWGDPIRLRHLYTSG	(M24)	(SEQ)	ID	NO:	24)) ;
RPLAFSDAGPHVYWGDPIRLRHLYTSG	(M25)	(SEQ ID NO: 25)) ; RPLAFSDSSPL			
VHWGDPIRLRHLYTSG	(M26)	(SEQ)	ID	NO:	26)) ;
RPLAFSDSSPHVHWGDPIRLRHLYTSG	(M27)	(SEQ)	ID	NO:	27)) ;
RPLAFSDAGPHVWGDPIRLRHLYTSG	(M28)	(SEQ)	ID	NO:	28)) ;
RPLAFSDAGPHVHYWGDPI RLRHLYTSG	(M29)	(SEQ)	ID	NO:	29)) ;
RPLAFSDAGPHVHYAWGDPIRLRHLYTSG	(M30)	(SEQ)	ID	NO:	30)) ;
RHIPDSSPLQFGAQVRLRHLYTSG	(M31)	(SEQ)	ID	NO:	31)) ;
RHIPDSSPLQFGDQVRLRHLYTSG	(M32)	(SEQ)	ID	NO:	32)) ;
RHIPDSSPLQFGPQVRLRHLYTSG	(M33)	(SEQ ID NO: 33)) ; RHIPDSSPL			
QFGGAVRLRHLYTSG	(M34)	(SEQ)	ID	NO:	34)) ;
RHIPDSSPLQFGGEVRLRHLYTSG	(M35)	(SEQ)	ID	NO:	35)) ;
RHIPDSSPLQFGGNVRLRHLYTSG	(M36)	(SEQ)	ID	NO:	36)) ;
RHIPDSSPLQFGGQARLRHLYTSG	(M37)	(SEQ)	ID	NO:	37)) ;

RHPIPDSPLLQFGGQIRLRHLYTSG (M38 (SEQ ID NO: 38)); RHPIPDSPLLQFGGQTRLRHLYTSG (M39 (SEQ ID NO: 39)); RHPIPDSPLLQFGWGQPVRLRHLYTSG (M40 (SEQ ID NO: 40)); DAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG (M74 (SEQ ID NO: 74)); VHYGWGDPIRLRHLYTSG (M75 (SEQ ID NO: 75)); RLRHLYTSG (M77 (SEQ ID NO: 77)); RHPIPDSPLLQFGWGDPPIRLRHLYTSG; RPLAFSDAGPLLQFGWGDPPIRLRHLYTSG; RHPIPDSPPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG; RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHLYTSG; RHPIPDSPPHVHYGGQVRLRHLYTSG; RPLAFSDAGPHVHYGGDIRLRHLYTSG; RDSS PLLQFGGQVRLRHLYTSG; RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGAQVRLRHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGDQVRLRHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGPQVRLRHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGGAVRLRHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGGEVR LRHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGGNVRLRHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGGQARL RHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGGQIRLRHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGGQTRL RHLYTSG; RHPIPDSPLLQFGWGQPVRLRHLYTSG, e para qualquer uma das sequências de peptídeos que precede o resíduo R amino-terminal podem ser excluídas.

[0050] As sequências de peptídeos da invenção incluem adicionalmente aquelas com indução ou formação de carcinoma hepatocelular (HCC) em comparação com FGF19 ou uma sequência variante de FGF 19 com qualquer uma das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído pela a sequência WGDPI em aminoácidos 16 a 20 de FGF19. As sequências de peptídeos da invenção incluem também aqueles com maior atividade hipoglicemiante em comparação com FGF19 ou uma sequência variante de FGF 19 tendo qualquer das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído para a sequência WGDPI

em aminoácidos 16 a 20 de FGF19. As sequências de peptídeos da invenção incluem, além disso, aqueles com menor crescimento de atividade de lipídeos (por exemplo, triglicerídeos, colesterol, não-HDL ou HDL) em comparação com FGF19 ou uma sequência variante de FGF 19 tendo qualquer das GQV, GDI, WGPI, WGDGV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído para a sequência WGDP em aminoácidos 16 a 20 de FGF19.

[0051] Tipicamente, o número de aminoácidos ou resíduos de uma sequência de peptídeo da invenção terá um total de menos de cerca de 250 (por exemplo, aminoácidos ou miméticos destes). Em várias formas de realização particulares, o número de resíduos compreende de cerca de 20 até cerca de 200 resíduos (por exemplo, aminoácidos ou miméticos destes). Em formas de realização adicionais, o número de resíduos compreende de cerca de 50 até cerca de 200 resíduos (por exemplo, aminoácidos ou miméticos destes). Em outras formas de realização o número de resíduos compreende desde cerca de 100 até cerca de 195 resíduos (por exemplo, aminoácidos ou miméticos destes) em comprimento.

[0052] Os aminoácidos ou resíduos podem ser ligados por amida ou através de ligações químicas não-naturais e não-amida, incluindo, por exemplo, os formados com glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, maleimidas bifuncionais ou N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Ligações não-amida incluem, por exemplo, cetometileno, aminometileno, olefina, éter, tioéter e semelhantes (ver, por exemplo, Spatola in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, vol. 7, pp 267-357 (1983), "Peptide and Backbone

Modifications", Marcel Decker, NY). Assim, quando um peptídeo da presente invenção inclui uma porção de uma sequência de FGF19 e uma porção de uma sequência de FGF21, as duas porções não precisam ser unidas uma à outra por uma ligação amida, mas podem ser unidas por qualquer outra porção química ou conjugadas em conjunto através de uma porção ligante.

[0053] A invenção também inclui subsequências, variantes e formas modificadas de sequências de peptídeos exemplificadas (incluindo as variantes FGF19 e FGF21 e subsequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1 e as fusões FGF19/FGF21 e quimeras listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), enquanto o anterior mantém, pelo menos, uma atividade ou função detectável ou mensurável. Por exemplo, certos peptídeos variantes exemplificados têm sequência C-terminal FGF19, PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLL QYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEE PEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK na porção C-terminal, por exemplo, seguindo os resíduos de aminoácidos "ETG" da variante.

[0054] Além disso, certos peptídeos variantes exemplificados, por exemplo, aqueles que têm toda ou uma porção da sequência de FGF21 no amino-terminal, tem um resíduo "R" posicionado no N-terminal, o qual pode ser omitido. Da mesma forma, certos peptídeos variantes exemplificados, incluem um resíduo de "M" posicionado no N-terminal, que pode ser adicionado a ou ainda substituído por um resíduo omitido, tal como um resíduo de "R". Mais particularmente, em várias formas de realização, sequências de peptídeos no N-terminal incluem qualquer de: RDSS, DSS, MDSS ou MRDSS. Além disso, em

células em que um resíduo "M" é adjacente a um resíduo "S", o resíduo "M" pode ser clivado de tal forma que o resíduo "M" é apagado da sequência de peptídeos, ao passo que quando o resíduo "M" é adjacente a um resíduo "D", o resíduo "M" não pode ser clivado. Assim, a título de exemplo, em várias formas de realização, sequências de peptídeos incluem aqueles com os seguintes resíduos no N-terminal: MDSSPL, MSDSSPL (clivada para SDSSPL) e MSSPL (clivada para SSPL).

[0055] Deste modo, sequências de "peptídeo", "polipeptídeo" e "proteína" da invenção incluem subsequências, variantes e formas modificadas das variantes e subsequências FGF19 e FGF21 listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1, e fusões e quimeras de FGF19/FGF21 listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1, contanto que a subsequência, variante ou forma modificada (por exemplo, fusão ou quimera) retenha pelo menos uma atividade ou função detectável.

[0056] Tal como aqui utilizado, o termo "modificar" e variações gramaticais destes, significa que a composição se desvia em relação a uma composição de referência, tal como uma sequência de peptídeo. Estas sequências de peptídeos modificadas, ácidos nucleicos e outras composições podem ter uma maior ou menor atividade ou função ou ter uma função ou atividade distinta em comparação com uma sequência de peptídeo referência não modificada, ácido nucleico ou outra composição ou pode ter uma propriedade desejável de uma proteína formulada para terapia (por exemplo, meia-vida do soro), para induzir anticorpos para o uso num ensaio de detecção e/ou para a purificação de proteínas. Por exemplo, uma sequência de peptídeo da invenção pode ser modificada para aumentar a meia-

vida do soro, para aumentar estabilidade da proteína *in vitro* e/ou *in vivo*, etc.

[0057] Os exemplos particulares de tais subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos aqui exemplificadas (por exemplo, uma sequência de peptídeo listada nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1) inclui substituições, deleções e/ou inserções/adições de um ou mais aminoácidos, para ou a partir do amino-terminal, carboxi-terminal ou internamente. Um exemplo é a substituição de um resíduo de aminoácido por outro resíduo de aminoácido dentro da sequência de peptídeo. Outro é uma deleção de um ou mais resíduos de aminoácidos a partir da sequência de peptídeo ou uma inserção ou adição de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de peptídeo.

[0058] O número de resíduos substituídos, eliminados ou inseridos/adicionados são um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1 a 3, 3 a 5, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 110, 110 a 120, 120 a 130, 130 a 140, 140 a 150, 150 a 160, 160 a 170, 170 a 180, 180 a 190, 190 a 200, 200 a 225, 225 a 250 ou mais) de uma sequência de peptídeos. Assim, uma sequência de FGF19 ou FGF21 pode ter poucos ou muitos aminoácidos substituídos, excluídos ou inseridos/adicionados (por exemplo, 1 a 3, 3 a 5, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 110, 110 a 120, 120 a 130, 130 a 140, 140 a 150, 150 a 160, 160 a 170, 170 a 180, 180 a 190, 190 a 200, 200 a 225, 225 a 250 ou mais). Além disso, uma sequência de aminoácidos FGF19 pode incluir ou consistir em uma sequência de aminoácidos de cerca de 1 a 3, 3 a 5, 5 a 10,

10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 110, 110 a 120, 120 a 130, 130 a 140, 140 a 150, 150 a 160, 160 a 170, 170 a 180, 180 a 190, 190 a 200, 200 a 225, 225 a 250 ou mais aminoácidos de FGF21 ou um aminoácido ou sequência de FGF21 pode incluir ou consistir em uma sequência de aminoácidos de cerca de 1 a 3, 3 a 5, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 110, 110 a 120, 120 a 130, 130 a 140, 140 a 150, 150 a 160, 160 a 170, 170 a 180, 180 a 190, 190 a 200, 200 a 225, 225 a 250 ou mais aminoácidos de FGF19.

[0059] Exemplos específicos de substituições incluem substituição de um resíduo de D para um resíduo L. Assim sendo, embora os resíduos estejam listados na configuração L-isômero, D-aminoácidos em particular ou qualquer de todas as posições das sequências de peptídeos da invenção estão incluídos, a não ser que um D-isômero leve a uma sequência que não tem nenhuma função detectável ou mensurável.

[0060] Exemplos específicos adicionais são substituições não-conservadoras e conservadoras. Uma "substituição conservadora" é a substituição de um aminoácido por um resíduo biologicamente, quimicamente ou estruturalmente semelhante. Biologicamente semelhante significa que a substituição é compatível com uma atividade biológica, por exemplo, atividade de redução de glicose. Estruturalmente semelhante significa que os aminoácidos têm cadeias laterais com comprimento semelhante, tal como alanina, glicina e serina, ou possuindo tamanho semelhante, ou a estrutura de uma primeira, segunda ou sequência de peptídeo adicional é mantida. Semelhança química significa que os resíduos têm a mesma carga ou são ambos

hidrofílicos e hidrofóbicos. Exemplos particulares incluem a substituição de um resíduo hidrofóbico, tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro, ou a substituição de um resíduo polar por outro, tal como a substituição de arginina por lisina, ácido glutâmico por ácido aspártico ou glutamina por asparagina, serina por treonina, etc. Ensaios de rotina podem ser utilizados para determinar se uma subsequência, variante ou forma modificada tem atividade, por exemplo, atividade de redução de glicose.

[0061] Os exemplos particulares de subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos aqui exemplificadas (por exemplo, uma sequência de peptídeo listada nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1) têm 50% a 60%, 60% a 70%, 70% a 75%, 75% a 80%, 80% a 85%, 85% a 90%, 90% a 95% ou 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com uma sequência de peptídeo de referência (por exemplo, uma sequência de peptídeo em qualquer uma das Tabelas 1 a 8 e Figura 1). O termo "identidade" e "homologia" e variações gramaticais, significa que duas ou mais entidades de referência são os mesmos. Assim, quando duas sequências de aminoácidos são idênticas, elas têm a sequência de aminoácidos idêntica. "Áreas, regiões ou domínios de identidade" significam que uma parte de duas ou mais entidades referenciadas são as mesmas. Assim, quando duas sequências de aminoácidos são idênticas ou homólogas sobre uma ou mais regiões da sequência, partilham identidade nestas regiões.

[0062] O grau de identidade entre duas sequências pode ser determinado utilizando um programa de computador e um algoritmo matemático conhecido na arte. Tais algoritmos que calculam a percentagem de identidade de sequência (homologia)

geralmente contam lacunas das sequências e desencontros sobre a região de comparação. Por exemplo, um algoritmo de busca BLAST (por exemplo, BLAST 2.0) (Ver, por exemplo, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990), acessível ao público através NCBI) tem parâmetros de pesquisa exemplares da seguinte forma: Incompatibilidade -2; lacuna aberta 5; extensão da lacuna 2. Para comparações de sequências de peptídeo, um algoritmo BLASTP é tipicamente utilizado em combinação com uma matriz de pontuação, tal como PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 ou BLOSUM 50. Programas de comparação de sequências FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) e SSEARCH também são utilizados para quantificar o grau de identidade (Pearson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185 (2000); e Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 147:195 (1981)). Programas para a quantificação de similaridade estrutural de proteína utilizando o mapeamento topológico baseado no Delaunay também têm sido desenvolvidos (Bostick *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 304:320 (2003)).

[0063] Na presente invenção, as sequências de peptídeos, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos aqui exemplificados (por exemplo, sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), um "aminoácido" ou "resíduo" inclui ácidos alfa-amino convencionais, bem como ácidos beta-amino, aminoácidos alfa, alfa-dissubstituídos e aminoácidos N-substituídos em que pelo menos uma cadeia lateral é uma porção de aminoácido de cadeia lateral tal como aqui definido. Um "aminoácido" inclui também os ácidos alfa-amino N-alquil, em que o grupo amino N-terminal tem um grupo alquila C₁ a C₆ linear ou ramificado substituinte.

O termo "aminoácido" inclui, por conseguinte, estereoisômeros e modificações de aminoácidos de ocorrência natural da proteína, aminoácidos não proteicos, aminoácidos modificados pós-tradução (por exemplo, por glicosilação, fosforilação, éster ou amida de clivagem, etc) aminoácidos enzimaticamente modificados ou sintetizados, aminoácidos derivados construções ou estruturas que imitam os aminoácidos, aminoácidos com uma porção de cadeia lateral modificada, derivados de porções de ocorrência natural ou sintética ou que não ocorrem naturalmente, etc. Aminoácidos modificados e não usuais estão incluídos nas sequências de peptídeos da invenção (ver, por exemplo, em Synthetic Peptides: A User's Guide; Hruby et al., *Biochem J.* 268:249 (1990), e Toniolo C., *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:287 (1990)).

[0064] Além disso, grupos de proteção e modificação dos aminoácidos estão incluídos. O termo "porção de cadeia lateral aminoácidos", tal como aqui utilizado, inclui qualquer cadeia lateral de qualquer aminoácido, tal como o termo "aminoácido" é aqui definido. Isto inclui, por conseguinte, a porção da cadeia lateral de aminoácidos que ocorrem naturalmente. Além disso, inclui porções de cadeia lateral em aminoácidos de ocorrência natural modificados como aqui estabelecidos e são conhecidos dos peritos na arte, tais como porções de cadeia lateral em estereoisômeros e modificações de aminoácidos de ocorrência natural da proteína, aminoácidos não proteicos, aminoácidos modificados pós-traducionalmente, aminoácidos enzimaticamente modificados ou sintetizados, aminoácidos derivados, construções ou estruturas que imitam os aminoácidos, etc. Por exemplo, a porção de cadeia lateral de

qualquer aminoácido aqui divulgado ou conhecido de um perito na arte está incluída no âmbito da definição.

[0065] A expressão "derivado de uma porção de aminoácido de cadeia lateral" está incluída dentro da definição de uma porção de aminoácido de cadeia lateral. Exemplos não limitativos de porções de aminoácidos de cadeia lateral derivados incluem, por exemplo: (a) adição de um ou mais átomos de carbono saturados ou insaturados a um grupo alquil, arila ou aralquil de cadeia existente, (b) substituição de um átomo de carbono na cadeia lateral com outro átomo, de preferência, de oxigênio ou de nitrogênio, (c) adição de um grupo terminal a um átomo de carbono da cadeia lateral, incluindo metil (-CH₃), metoxi (-OCH₃), nitro (-NO₂), hidroxila (-OH) ou ciano (-C≡N), (d) porções de cadeia lateral, incluindo um grupo hidroxi, tiol ou amino, adicionando um hidroxi, tiol ou grupo protetor de amino adequado, ou (e) porções de cadeia lateral incluindo uma estrutura em anel, a adição de um ou mais substituintes do anel, incluindo hidroxila, halogênio, alquil ou grupos arila ligados diretamente ou através de uma ligação éter. Para os grupos amino, os grupos protetores adequados são conhecidos pelos especialistas na matéria. Desde que tal derivação forneça uma atividade desejada na sequência do peptídeo final (por exemplo, redução da glicemia, glicose ou o metabolismo dos lipídeos melhorado, a atividade antidiabética, ausência de formação de HCC substancial ou tumorigênese, ausência de modulação significativa da massa magra ou gorda, etc).

[0066] Uma "porção de aminoácido cadeia de lateral" inclui todas tais derivações e em particular os exemplos não-

limitativos incluem: ácido butírico gama-amino, ácido dodecanóico 12-amino, ácido alfa-aminoisobutírico, ácido 6-amino hexanóico, ácido carboxílico 4-(aminometil)-ciclohexano, ácido 8-aminoctanóico, bifenilalanina, Boc-t-butoxicarbonil, benzila, benzoila, citrulina, ácido diaminobutírico, pirrollisina, ácido diaminopropiônico, 3,3-difenilalanina, ortonina, citrulina, ácido 1,3-di-hidro-2H-isoindolcarboxílico, etil, Fmoc-fluorenilmethoxycarbonil, heptanoíla ($\text{CH}_3 - (\text{CH}_2) \cdot \text{sub.} 5 - \text{C}(=\text{O}) - \text{--}$), hexanoil ($\text{CH}_3 - (\text{CH}_2) \cdot 4 - \text{C}(=\text{O}) - \text{--}$), homoarginina, homocisteína, homolisina, homofenilalanina, homoserina, metil, sulfóxido de metionina, metionina sulfona, norvalina (VAL), fenilglicina, propil, isopropil, sarcosina (SAR), terc-butilalanina e benziloxicarbonil.

[0067] Um único aminoácido, incluindo estereoisômeros e modificações de aminoácidos da proteína de ocorrência natural, aminoácidos não proteicos, aminoácidos modificados pós-tradução, aminoácidos enzimaticamente sintetizados, aminoácidos que não ocorrem naturalmente, incluindo os aminoácidos derivados, um aminoácido alfa, alfa dissubstituído derivado a partir de qualquer um dos anteriores (por exemplo, aminoácido alfa, alfa dissubstituído, em que pelo menos uma cadeia lateral é a mesma que a do resíduo a partir do qual é derivado), um beta-aminoácido derivado de qualquer um dos anteriores (isto é, um beta-aminoácido que, exceto para a presença de um beta-carbono, é de outro modo o mesmo que o resíduo a partir do qual é derivado), etc., incluindo tudo o que precede pode ser aqui referido como um "resíduo". Substituintes adequados, em adição à porção de cadeia lateral

do ácido alfa-amino, incluem alquil C1 a C6 linear ou ramificado. Aib é um exemplo de um aminoácido alfa, alfa dissustituído. Enquanto aminoácidos alfa, alfa dissustituídos podem ser referidos usando referências convencionais isoméricas L- e D-, é para ser entendido que essas referências são para conveniência, e que, quando os substituintes na posição-alfa são diferentes, tal aminoácido pode indiferentemente ser referido como um aminoácido alfa, alfa dissustituído derivado de isômero L- ou D-, conforme apropriado, de um resíduo com a porção de aminoácido de cadeia lateral designada. Assim, o ácido (S)-2-Amino-2-metilhexanóico pode ser referido tanto como um aminoácido alfa, alfa dissustituído derivado a partir da L-Nle (Norleucina) ou como um aminoácido alfa, alfa dissustituído derivado a partir de D-Ala. Da mesma forma, Aib pode ser referido como um aminoácido alfa, alfa dissustituído derivado a partir de Ala. Sempre que um aminoácido alfa, alfa dissustituído é fornecido, é para ser entendido como incluindo todos as configurações (R) e (S) da mesma.

[0068] Um "amino ácido N-sustituído" inclui qualquer aminoácido, em que uma fração de aminoácido de cadeia lateral é covalentemente ligado ao grupo amino da espinha dorsal, opcionalmente, em que não existem outros substituintes que não H na posição alfa-carbono. Sarcosina é um exemplo de um aminoácido N-sustituído. A título de exemplo, sarcosina pode ser referida como um derivado de aminoácido N-sustituído de Ala, em que a porção de aminoácido de cadeia lateral de sarcosina e Ala é a mesma, isto é, metila.

[0069] As modificações covalentes das sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos aqui exemplificados (por exemplo, sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), estão incluídas na invenção. Um tipo de modificação covalente inclui reagir resíduos de aminoácido alvo com um agente de derivação orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais selecionadas ou resíduos N- ou C-terminais do peptídeo. A derivação com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para o peptídeo de ligação cruzada para uma matriz de suporte insolúvel em água ou superfície para uso no método para purificação de anticorpos anti-peptídeo e vice-versa. Os agentes de reticulação vulgarmente utilizados incluem, por exemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalícílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de dissuccinimidil tais como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionais tais como bis-N-maleimido-1,8-octano e agentes tais como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

[0070] Outras modificações incluem desamidação de resíduos glutaminil e asparaginil aos resíduos glutamil e aspartil correspondentes, respectivamente, hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos serila ou treonila, metilação dos grupos alfa-amino de lisina, arginina, e cadeias laterais de histidina (TE Creighton, Proteins: Structure e Molecular Properties, WH Freeman & Co., San Francisco, pp 79-86 (1983)), acetilação da amina N-terminal, a amidação de qualquer grupo carboxila C-terminal, etc.

[0071] Sequências de peptídeos exemplificadas, e subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos aqui exemplificados (por exemplo, sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), pode também incluir alterações da coluna vertebral para a estabilidade, derivados e peptidomiméticos. O termo "peptidomimético" inclui uma molécula que é um mímico de um resíduo (referido como um "mimético"), incluindo, mas não se limitando a moléculas de núcleo de piperazina, moléculas de núcleo ceto-piperazina e moléculas de núcleo de diazepina. A menos que especificado de outra forma, um mimético de aminoácido de uma sequência de peptídeo da invenção inclui tanto um grupo carboxila e um grupo amino e um grupo que corresponde a uma cadeia lateral de aminoácido, ou, no caso de um mimético de glicina, sem cadeia lateral a não ser hidrogênio.

[0072] A título de exemplo, estas incluem os compostos que imitam os estéricos, distribuição da carga de superfície, polaridade, etc, de um aminoácido que ocorre naturalmente, mas não tem de ser um aminoácido, que conferem estabilidade no sistema biológico. Por exemplo, a Prolina pode ser substituída por outras lactamas ou lactonas de tamanho e de substituição adequado; Leucina pode ser substituída por uma alquil-cetona, amida N-substituída, bem como as variações de aminoácidos em comprimento da cadeia lateral usando um grupo alquil, alcenil ou outros substituintes, outros podem ser evidentes para o perito na arte. O elemento essencial para fazer tais substituições é proporcionar uma molécula de aproximadamente o mesmo tamanho e carga e configuração que o resíduo utilizado para desenhar a molécula. Refinamento destas modificações será

feito por meio da análise dos compostos em um funcional (por exemplo, redução da glicemia) ou outro ensaio, e comparando a relação de atividade da estrutura. Tais métodos estão dentro do âmbito de trabalho do perito na especialidade em química medicinal e o desenvolvimento de drogas.

[0073] Um outro tipo de modificação das sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes de sequências e formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificados (incluindo os peptídeos listados nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), é glicosilação. Tal como aqui utilizado, "glicosilação" refere-se amplamente à presença, adição ou inserção de uma ou mais porções de açúcar (por exemplo, carboidratos) a proteínas, lipídeos ou outras moléculas orgânicas. O uso do termo "desglicosilação" aqui geralmente pretende significar a eliminação ou supressão de uma ou mais porções de açúcar (por exemplo, carboidratos). Além disso, a frase inclui alterações qualitativas na glicosilação das proteínas nativas envolvendo uma alteração no tipo e proporções (quantidade) das várias porções de açúcares (por exemplo, carboidratos) presentes.

[0074] A glicosilação pode ser conseguida por modificação de um resíduo de aminoácido ou pela adição de um ou mais locais de glicosilação que podem ou não estar presentes na sequência nativa. Por exemplo, um resíduo tipicamente não-glicosilado pode ser substituído por um resíduo que pode ser glicosilado. A adição de locais de glicosilação pode ser realizada alterando a sequência de aminoácidos. A alteração da sequência de peptídeo pode ser feita, por exemplo, pela adição ou substituição por um ou mais resíduos de serina ou treonina

(para locais de glicosilação O-ligados) ou resíduos de asparagina (para locais de glicosilação N-ligados). As estruturas de oligossacarídeos N-ligados e O-ligados e os resíduos de açúcar encontrados em cada tipo podem ser diferentes. Um tipo de açúcar que é comumente encontrado em ambos é o ácido N-acetil-neuramico (doravante referido como ácido siálico). O ácido siálico é normalmente o resíduo terminal tanto de oligossacarídeos N-ligados e O-ligados e, em virtude da sua carga negativa, pode conferir propriedades ácidas à glicoproteína.

[0075] As sequências de peptídeos da invenção podem opcionalmente ser alteradas através de alterações no nível nucleotídeo (por exemplo, DNA), em particular por mutação do DNA que codifica o peptídeo em bases pré-selecionadas tal que sejam gerados códons que irão traduzir nos aminoácidos desejados. Outro meio de aumentar o número de porções de carboidrato no peptídeo é por acoplamento químico ou enzimático de glicosídeos ao polipeptídeo (ver, por exemplo, em WO 87/05330). Desglicosilação pode ser conseguida através da remoção do local de glicosilação subjacente por deleção da glicosilação por meios químicos e/ou enzimáticos ou por substituição de códons que codificam os resíduos de aminoácidos que são glicosilados. As técnicas de desglicosilação química são conhecidas e a clivagem enzimática de porções do carboidrato em polipeptídeos pode ser alcançada através do uso de uma variedade de endo- e exo-glicosidases.

[0076] Várias linhas de células podem ser usadas para produzir proteínas que estão glicosiladas. Um exemplo não limitativo é redutase di-hidrofolato (DHFR) - células de

ovário de hamster chinês deficiente (CHO), que são de uma célula hospedeira utilizada para a produção de glicoproteínas recombinantes. Estas células não expressam a enzima betagalactosídeo alfa- 2,6-sialiltransferase e, portanto, não adicionam ácido siálico na ligação alfa-2,6 de oligossacarídeos N-ligados de glicoproteínas produzidas nestas células.

[0077] Um outro tipo de modificação é conjugar (por exemplo, ligar) um ou mais componentes adicionais ou moléculas no N-e/ou C-terminal de uma sequência de peptídeo da invenção, tais como uma outra proteína (por exemplo, uma proteína que possua uma sequência de grupo amino de ácido heterólogo para a proteína paciente) ou uma molécula carreadora. Assim, uma sequência de peptídeo exemplar pode ser um conjugada com um outro componente ou molécula.

[0078] Em determinadas formas de realização, amino- ou carboxi-terminais de uma sequência de peptídeo da invenção podem ser fundidas com uma região Fc de imunoglobulina (por exemplo, Fc humana) para formar um conjugado de fusão (ou molécula de fusão). Conjugados de fusão Fc podem aumentar a meia-vida sistêmica de produtos biofarmacêuticos e, assim, o produto biofarmacêutico pode ter atividade prolongada ou exigir uma administração menos frequente. Fc liga-se ao receptor Fc neonatal (FcRn) nas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos e, após ligação, a molécula de fusão de Fc está protegido contra a degradação e re-liberação para dentro da circulação, mantendo a molécula em circulação por mais tempo. Acredita-se que esta ligação Fc seja o mecanismo pelo qual a IgG endógeno mantém a sua meia-vida no plasma por mais tempo.

Drogas de fusão Fc bem conhecidas e validadas consistem em duas cópias de um biofarmacêutico ligadas com a região Fc de um anticorpo para melhorar a farmacocinética, solubilidade e a eficiência da produção. Mais recentemente, a tecnologia de fusão de Fc liga uma única cópia de um biofarmacêutico a uma região Fc de um anticorpo para otimizar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do biofarmacêutico, em comparação com os conjugados de fusão Fc tradicionais.

[0079] Uma modificação do conjugado pode ser usada para produzir uma sequência de peptídeo que retém a atividade com uma função ou atividade adicional ou complementar da segunda molécula. Por exemplo, uma sequência de peptídeo pode ser conjugada com uma molécula, por exemplo, para facilitar a solubilidade, armazenamento, *in vivo* ou meia-vida de prateleira ou estabilidade, redução da imunogenicidade, liberação controlada ou retardada *in vivo*, etc. Outras funções ou atividades incluem um conjugado que reduz a toxicidade em relação a uma sequência de peptídeo não conjugado, um conjugado que atinge um tipo de célula ou órgão mais eficientemente do que uma sequência de peptídeo não conjugado ou um medicamento para combater melhor as causas ou efeitos associados com uma desordem ou doença, tal como definido aqui (por exemplo, a diabetes).

[0080] A eficácia clínica da terapia de proteínas pode ser limitada pela curta meia-vida plasmática e susceptibilidade à degradação. Estudos de várias proteínas terapêuticas mostraram que várias modificações, incluindo a conjugação ou ligação da sequência de peptídeo de qualquer uma de uma variedade de polímeros não proteináceos, por exemplo, polietileno glicol

(PEG), polipropilenoglicol ou polioxialquilenos (ver, por exemplo, tipicamente através de uma ligação da fração ligada covalentemente tanto à proteína e ao polímero não proteináceo (por exemplo, um PEG) pode prolongar a meia-vida. Tais biomoléculas conjugadas de PEG mostraram possuir propriedades clinicamente úteis, incluindo melhor estabilidade física e térmica, proteção contra a susceptibilidade à degradação enzimática, solubilidade aumentada, meia-vida circulante *in vivo* mais prolongada e uma depuração diminuída, imunogenicidade e antigenicidade reduzidas e toxicidade reduzida.

[0081] PEGs adequados para conjugação à uma sequência da invenção é geralmente solúvel em água à temperatura ambiente e têm a fórmula geral $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, onde R é hidrogênio ou um grupo protetor tal como um grupo alquil ou um grupo alanol e em que n é um número inteiro de 1 a 1000. Quando R é um grupo de proteção, tem geralmente 1 a 8 átomos de carbono. O PEG conjugado à sequência de peptídeo pode ser linear ou ramificado. Os derivados de PEG ramificados, "estrela-PEG" e PEG multi-armados são incluídos na invenção. Um peso molecular do PEG utilizado na presente invenção não é restrito a qualquer intervalo particular, mas certas formas de realização tem um peso molecular entre 500 e 20.000, enquanto outras formas de realização tem um peso molecular entre 4.000 e 10.000.

[0082] A invenção inclui composições de conjugados em que os PEGs têm diferentes valores de "n" e, portanto, os vários diferentes PEG estão presentes em proporções específicas. Por exemplo, algumas composições compreendem uma mistura de

conjugados em que $n=1$, 2, 3 e 4. Em algumas composições, a percentagem de conjugados em que $n=1$ é de 18 a 25%, a percentagem de conjugados em que $n=2$ é 50 a 66%, a percentagem de conjugados em que $n=3$ é 12 a 16% e a percentagem de conjugados em que $n=4$ é até 5%. Tais composições podem ser produzidas por condições de reação e os métodos de purificação conhecidos na arte.

[0083] PEG pode diretamente ou indiretamente (por exemplo, através de um intermediário) ligar-se às sequências de peptídeos da invenção. Por exemplo, em uma forma de realização, o PEG se liga por meio de um grupo reativo do terminal (um "espaçador"). O espaçador é, por exemplo, um grupo reativo terminal que media uma ligação entre os grupos amino ou carboxila livres de uma ou mais das sequências de peptídeos e de polietileno glicol. O PEG que tem o espaçador, que pode ser ligado ao grupo amino livre, incluindo o polietilenoglicol N-hidroxisuccinilimida, que pode ser preparado por ativação de éster do ácido succínico de polietilenoglicol com N-hidroxisuccinilimida. Outro polietilenoglicol ativado, o qual pode ser ligado ao grupo amino livre, é 2,4-bis(O-metoxipolietilenoglicol)-6-cloro-s-triazina, que pode ser preparado por reação de polietileno glicol éter monometílico com cloreto cianúrico. O polietileno glicol ativado que é ligado ao grupo carboxila livre, inclui polioxietilenodiamina.

[0084] A conjugação de uma ou mais das sequências de peptídeos da invenção ao PEG que tem um espaçador pode ser efetuada através de vários métodos convencionais. Por exemplo, a reação de conjugação pode ser realizada em solução a um pH

de 5 a 10, à temperatura de 4°C até à temperatura ambiente, durante 30 minutos a 20 horas, utilizando uma razão molar de reagente de proteína de a partir de 4:1 a 30:1. As condições de reação podem ser selecionadas para direcionar a reação no sentido de produzir predominantemente um grau de substituição desejado. Em geral, temperatura baixa, pH baixo (por exemplo, pH=5) e tempo de reação curto tendem a diminuir o número de PEGs ligados, enquanto que a alta temperatura, um pH neutro a elevado (por exemplo, pH≥7) e maior tempo de reação tendem a aumentar o número de PEGs ligados. Vários métodos conhecidos no estado da arte podem ser utilizados para terminar a reação. Em algumas formas de realização, a reação é terminada por acidificação da mistura reacional e congelamento a, por exemplo, -20°C.

[0085] Sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes de sequências e formas modificadas de as sequências de peptídeos exemplificados (incluindo os peptídeos listados nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), incluem ainda a conjugação de macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas, tais como proteínas; polissacáridos, tais como sefareose, agarose, celulose, esferas de celulose, aminoácidos poliméricos, tais como ácido poliglutâmico, polilisina, copolímeros de aminoácidos; partículas de vírus inativos; toxinas bacterianas inativadas tais como toxóide da difteria, tétano, cólera, moléculas de leucotoxina; bactérias inativadas e as células dendríticas. Tais formas conjugadas, se desejado, podem ser utilizadas para produzir anticorpos contra as sequências de peptídeos da invenção.

[0086] Componentes adequados adicionais e moléculas de conjugação incluem, por exemplo, a tiroglobulina, albuminas tais como albumina do soro humano (HSA); toxóide do tétano; toxóide diftérico, poliaminoácidos tais como poli(D-lisina:ácido D-glutâmico); polipeptídeos de rotavírus VP6; hemaglutinina do vírus da gripe, a nucleoproteína do vírus influenza; hemocianina Keyhole Limpet (KLH) e proteína do núcleo do vírus da hepatite B e do antígeno de superfície ou qualquer combinação dos anteriores.

[0087] A fusão de albumina a uma sequência de peptídeo invenção pode, por exemplo, ser conseguida por manipulação genética, de tal modo que o DNA que codifica a HSA (albumina sérica humana) ou um seu fragmento, seja ligado ao DNA que codifica para uma sequência de peptídeo. Depois disso, um hospedeiro adequado pode ser transformado ou transfectado com a sequência de nucleotídeos fundida sob a forma de, por exemplo, um plasmídeo adequado, de modo a expressar um polipeptídeo de fusão. A expressão pode ser efetuada *in vitro* a partir de, por exemplo, células procarióticas ou eucarióticas, ou *in vivo*, a partir de, por exemplo, um organismo transgênico. Em algumas formas de realização da invenção, a expressão da proteína de fusão é realizada em linhas celulares de mamíferos, por exemplo, linhas celulares de CHO.

[0088] Outros meios para fundir geneticamente proteínas alvo ou peptídeos de albumina incluem uma tecnologia conhecida como Albufuse® (Novozymes Biopharma A/S, Dinamarca) e as sequências de peptídeos terapêuticos conjugados frequentemente tornam-se muito mais eficazes com melhor absorção no organismo. A

tecnologia tem sido utilizada comercialmente para produzir Albuferon® (Human Genome Sciences), uma combinação de albumina e interferon α-2B utilizados para tratar a infecção pelo vírus da hepatite C.

[0089] Uma outra forma de realização envolve o uso de um ou mais anticorpos humanos de domínio (dAb). dAbs são as menores unidades funcionais de ligação de anticorpos humanos (IgGs) e têm características de estabilidade e solubilidade favoráveis. A tecnologia envolve um dAb (s) conjugado à HSA (formando assim um "AlbuldAb", ver, por exemplo, EP1517921B, WO2005/118642 e WO2006/051288) e uma molécula de interesse (por exemplo, uma sequência de peptídeos da invenção). AlbuldAbs são muitas vezes menores e mais fáceis de fabricar em sistemas de expressão microbianos, tais como bactérias ou fungos, do que as atuais tecnologias utilizadas para prolongar o tempo de meia-vida dos peptídeos. Como HSA tem uma meia-vida de cerca de três semanas, a molécula conjugada resultante melhora a meia-vida. Uso da tecnologia de dAb pode também melhorar a eficácia da molécula de interesse.

[0090] Componentes adequados adicionais e moléculas para conjugação incluem as que são adequadas para o isolamento ou purificação. Exemplos não-limitativos particulares incluem moléculas de ligação, tal como biotina (par de ligação específico avidina-biotina), um anticorpo, um receptor, um ligante, uma lectina ou moléculas que compreendem um suporte sólido, incluindo, por exemplo, de plástico ou de pérolas de poliestireno, placas ou grânulos, esferas magnéticas, tiras de teste e membranas.

[0091] Os métodos de purificação, tais como cromatografia de troca catiônica, podem ser usados para separar conjugados por diferença de carga, o que separa efetivamente os conjugados nos seus vários pesos moleculares. Por exemplo, a coluna de permuta catiônica pode ser carregada e depois lavada com ~20mM de acetato de sódio, pH~4 e, em seguida, eluída com um gradiente linear (0M a 0,5 M) de NaCl tamponada a um pH de 3 a 5,5, de preferência a um pH~4.5. O conteúdo das frações obtidas por cromatografia de permuta catiônica pode ser identificado pelo peso molecular usando métodos convencionais, por exemplo, espectroscopia de massa, SDS-PAGE ou outros métodos conhecidos para separar entidades moleculares pelo peso molecular. Uma fração é então adequadamente identificada, que contém o conjugado possuindo o número desejado de PEGs ligados, purificada livre de sequências de proteínas não modificadas e de conjugados com outros números de PEGs ligados.

[0092] Ainda em outras formas de realização, uma sequência de peptídeo da invenção está relacionada com um agente químico (por exemplo, uma imunotoxina ou agente quimioterapêutico), incluindo, mas não se limitam a, um agente citotóxico, incluindo taxol, citocalasina B, gramicidina D, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina e análogos ou homólogos destes. Outros agentes químicos incluem, por exemplo, anti-metabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracila decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, carmustina e lomustina, ciclotosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina,

mitomicina C e cisplatina), antibióticos (por exemplo, bleomicina) e agentes anti-mitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina). Citotoxinas podem ser conjugadas a um peptídeo da invenção utilizando a tecnologia de ligante conhecido na arte e aqui descrito.

[0093] Outros componentes adequados e moléculas para conjugação incluem as que são adequadas para a detecção de um ensaio. Exemplos não-limitativos particulares incluem marcadores detectáveis, tal como um radioisótopo (por exemplo, ^{125}I , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P), uma enzima que gera um produto detectável (por exemplo, luciferase, β -galactosidase, peroxidase de rábano silvestre e fosfatase alcalina), uma proteína fluorescente, uma proteína cromogênica, corante (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína); metais emissores de fluorescência (por exemplo, ^{152}Eu); compostos quimioluminescentes (por exemplo, luminol e sais de acridinio), compostos bioluminescentes (por exemplo, luciferina) e as proteínas fluorescentes. Marcadores indiretos incluem anticorpos marcados ou detectáveis que se ligam a uma sequência de peptídeo, em que o antícorpo pode ser detectado.

[0094] Em certas formas de realização, uma sequência de peptídeo da presente invenção é conjugada a um isótopo radioativo para gerar um radiofármaco citotóxico (radioimunoconjugados) úteis como um agente de diagnóstico ou terapêutico. Exemplos de tais isótopos radioativos incluem, mas não estão limitados a, iodo ^{131}I , índio ^{113}In , ítrio ^{90}Ir e lutécio ^{177}Lu . Métodos para a preparação de radioimunoconjugados são conhecidos pelos especialistas na matéria. Exemplos de

radioimunoconjugados que estão disponíveis comercialmente incluem ibritumomab, tiuxetano e tositumomab.

[0095] Outros meios e métodos incluídos na invenção para prolongar a meia-vida de circulação, aumentando a estabilidade, reduzindo a folga ou alterar a imunogenicidade ou alergenicidade de uma sequência de peptídeos da invenção envolve a modificação da sequência de peptídeo por HESylation, que utiliza derivados de amido hidroxietil ligados a outras moléculas, a fim de modificar as características da molécula. Vários aspectos da HESylation são descritos na, por exemplo, Patente U.S. Appln. N°s 2007/0134197 e 2006/0258607.

[0096] Qualquer um dos componentes acima e moléculas usadas para modificar as sequências de peptídeos da invenção podem opcionalmente ser conjugados através de um ligante. Os ligantes adequados incluem ligantes "flexíveis" que são, geralmente, de comprimento suficiente para permitir algum movimento entre as sequências de peptídeos modificados e os componentes ligados e moléculas. As moléculas de ligação são geralmente de cerca de 6 a 50 átomos de comprimento. As moléculas de ligação podem também ser, por exemplo, aril acetileno, oligômeros de etileno glicol contendo 2 a 10 unidades monoméricas, diaminas, diácidos, aminoácidos ou suas combinações. Os ligantes adequados podem ser facilmente selecionados e pode ser de qualquer comprimento adequado, tais como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 50 aminoácidos (por exemplo, Gli).

[0097] Os ligantes flexíveis exemplares incluem polímeros de glicina (G_n), polímeros de glicina-serina (por exemplo, $(GS)_n$, $GS(GS)_n$ e $GG(GS)_n$, onde n é um número inteiro de pelo menos um),

polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina e outros ligantes flexíveis. Os polímeros de glicina e glicina-serina são relativamente não estruturados e, portanto, podem servir como uma amarra neutra entre componentes. Os ligantes flexíveis exemplares incluem, mas não estão limitados a GGSG, GGSAG, GSGSG, GSAGG, GGGSG e GSAGG.

[0098] As sequências de peptídeos da invenção, incluindo as variantes e subsequências FGF19 e FGF21 e as fusões e quimeras FGF19/FGF21 listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1, bem como subsequências, variantes de sequências e formas modificadas das sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1 tem uma ou mais atividades como aqui estabelecido. Um exemplo de uma atividade é atividade de redução de glicose. Outro exemplo de uma atividade é a estimulação ou formação reduzida de carcinoma hepatocelular (HCC), por exemplo, em comparação com FGF19. Um exemplo adicional de uma atividade é diminuição ou redução de lipídeos (por exemplo, triglicerídeos, colesterol, não-HDL), aumento de atividade HDL, por exemplo, em comparação com o FGF21. Outro exemplo de uma atividade é uma baixa ou reduzida massa muscular magra reduzindo a atividade da massa, por exemplo, em comparação com FGF21. Ainda outro exemplo de uma atividade é a ligação ao receptor-4 do fator de crescimento de fibroblastos (GFR4) ou ativando FGFR4, por exemplo, as sequências de peptídeos que se ligam a FGFR4 com uma afinidade comparável ou maior do que a afinidade de ligação FGF19 para FGFR4, e sequências de peptídeos que ativam FGFR4 a uma extensão ou quantidade equivalente ou maior do que FGF19 ativa FGFR4. Ainda outros exemplos de atividades incluem a regulação negativa ou redução da expressão do gene da aldo-

ceto redutase, por exemplo, em comparação com FGF19; sobre-regulação ou o aumento da expressão do gene Slc1a2em comparação com FGF21.

[0099] Mais particularmente, as sequências de peptídeos da invenção, incluindo variantes e subsequências FGF19 e FGF21 e as fusões e quimeras FGF19/FGF21 listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1, bem como subsequências, variantes e formas modificadas das sequências listados nas Tabelas 1 a 8 e na Figura 1 incluem os que têm as seguintes atividades: sequências de peptídeo tendo reduzida formação de carcinoma hepatocelular (HCC), em comparação com a formação de FGF19 ou uma variante de sequência de FGF 19 tendo qualquer das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído para a sequência WGDPI em aminoácidos 16 a 20 de FGF19; sequências de peptídeos com maior atividade de redução da glicemia em comparação com FGF19 ou sequência variante FGF 19 com uma das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído para a sequência WGDPI em aminoácidos 16 a 20 de FGF19; sequências de peptídeos com menor atividade crescente dos lipídios (por exemplo, menos de triglicerídeos, colesterol, não-HDL) ou maior aumento da atividade de HDL em comparação com FGF19, ou uma sequência variante FGF 19, com uma das GQV, GDI, WGPI, WGDPV, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP ou FGDPI substituído para a sequência WGDPI em aminoácidos 16 a 20 de FGF19, e sequências de peptídeos com menos massa magra reduzindo a atividade em comparação com FGF21.

[0100] Mais particularmente, as sequências de peptídeos da invenção, incluindo variantes e subsequências de FGF19 e FGF21 e fusões e quimeras de FGF19/FGF21 listados nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1, bem como subsequências, variantes e formas modificadas das sequências listados nas Tabelas 1 a 8 e na Figura 1 incluem os que têm as seguintes atividades: sequências de peptídeos que se ligam ao receptor do fator de crescimento de fibroblastos-4 (FGFR4) ou ativar FGFR4, tais como sequências de peptídeos que se ligam a FGFR4 com uma afinidade de FGF19 comparável ou maior que afinidade de ligação para FGFR4; sequências de peptídeo que ativam FGFR4 a uma extensão ou quantidade equivalente ou maior do que FGF19 ativa FGFR4; sequências de peptídeos que regulam para baixo ou reduzem a expressão do gene da redutase aldo-ceto, por exemplo, em comparação com FGF19; sequências de peptídeo que regulam para cima ou aumentam a família portadora do carreador 1, membros 2 (Slc1a2) a expressão do gene em comparação com FGF21.

[0101] As atividades tais como, por exemplo, formação de carcinoma hepatocelular (HCC) ou tumorigenesis, atividade de redução da glicose, aumento da atividade de lipídios ou redução da atividade massa magra pode ser verificada em um animal, como um rato *db/db*. Medição da ligação a FGFR4 ou ativação do FGFR4 pode ser determinada através de ensaios aqui descritos (ver, por exemplo, Exemplo 1) ou conhecida para o especialista na matéria.

[0102] O termo "ligar" ou "ligação", quando utilizado em referência a uma sequência de peptídeo, significa que a sequência do peptídeo interage ao nível molecular. Assim, uma

sequência de peptídeo que se liga a FGFR4 liga-se a totalidade ou uma parte da sequência do FGFR4. Ligação específica e seletiva pode ser distinguida de ligação utilizando ensaios não específicos, conhecidos na arte (por exemplo, ligação de competição, imunoprecipitação, ELISA, citometria de fluxo, Western blot).

[0103] Os peptídeos e peptidomiméticos podem ser produzidos e isolados utilizando métodos conhecidos na arte. Os peptídeos podem ser sintetizados, no todo ou em parte, usando métodos químicos (veja, por exemplo, Caruthers (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215, Horn (1980); e Banga, A.K., *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA). A síntese de peptídeos pode ser realizada usando várias técnicas de fase sólida (ver, por exemplo, Roberge *Science* 269:202 (1995); Merrifield, *Methods Enzymol* 289:3 (1997)) e a síntese automática pode ser conseguida, por exemplo, utilizando o ABI 431A *Peptide Synthesizer* (Perkin Elmer), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos e miméticos de peptídeos podem também ser sintetizados utilizando metodologias combinatórias. Resíduos sintéticos e polipeptídeos incorporando miméticos podem ser sintetizados utilizando uma variedade de processos e metodologias conhecidas na técnica (ver, por exemplo, *Organic Syntheses Collective Volumes*, Gilman, et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque). Peptídeos modificados podem ser produzidos por métodos de modificação química (ver, por exemplo, Belousov, *Nucleic Acids Res.* 25:3440 (1997); Frenkel, *Free Radic. Biol. Med.* 19:373 (1995); e Blommers, *Biochemistry*

33:7886 (1994)). Variações na sequência de peptídeo, derivados, substituições e modificações podem ser feitas usando métodos tais como mediada por oligonucleotídeos (dirigida ao local), mutagênese, varrimento de alanina e mutagênese baseado PCR. A mutagênese dirigida ao local (Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986), Zoller et al., *Nucl. Acids Res.* 10:6487 (1987)), mutagênese de cassette (Wells et al., *Gene* 34:315 (1985)), mutagênese de seleção de restrição (Wells et al. *Philos. Trans. R. Soc. London SerA* 317:415 (1986)) e outras técnicas podem ser realizadas no DNA clonado para produzir sequências de invenção peptídicos, variantes, fusões, quimeras e variações, derivados, substituições e modificações destes.

[0104] A sequência de peptídeo "sintetizada" ou "fabricada" é um peptídeo feito por qualquer método que envolve a manipulação pela mão do homem. Tais métodos incluem, mas não estão limitados ao acima mencionado, tal como a síntese química, a tecnologia de DNA recombinante, a fragmentação bioquímica ou enzimática de moléculas maiores e combinações dos anteriores.

[0105] As sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes de sequências e formas modificadas das sequências exemplificadas de peptídeos (por exemplo, sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e na Figura 1), podem também ser modificadas de modo a formar uma molécula quimérica. De acordo com a invenção, há sequências de peptídeos previstas que incluem um domínio heterólogo. Esses domínios podem ser adicionados ao terminal amino ou no terminal carboxila da sequência de peptídeo. Domínios

heterólogos também podem ser posicionados no interior da sequência de peptídeo, e/ou alternativamente flanqueado por FGF19 e/ou sequências de aminoácidos derivadas FGF21.

[0106] O termo “peptídeo” inclui também dímeros ou multímeros (oligômeros) de peptídeos. De acordo com a invenção, também são fornecidos dímeros ou multímeros (oligômeros) das sequências de peptídeos exemplificados, bem como subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificados (por exemplo, sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e na Figura 1).

[0107] A invenção proporciona ainda moléculas de ácido nucleico que codificam sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes de sequências e formas modificadas das sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1 e vetores que incluem o ácido nucleico que codifica o peptídeo. Por conseguinte, “ácidos nucleicos” incluem aqueles que codificam as sequências de peptídeos exemplificados aqui descritos, bem como aqueles que codificam para subsequências funcionais, variantes de sequências e as formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificados, tanto tempo quanto o que precede retém a atividade ou função detectável ou mensurável. Por exemplo, uma subsequência, uma variante ou uma forma modificada de um peptídeo de sequência exemplificada aqui divulgadas (por exemplo, uma sequência listada nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1) que retém alguma capacidade para diminuir ou reduzir a glicose, fornece a homeostase normal da glicose ou reduz as condições histopatológicas associadas à hiperglicemia crônica ou aguda *in vivo*, etc.

[0108] O ácido nucleico, o qual também pode ser referido aqui como um gene, polinucleotídeo, sequência de nucleotídeos, iniciadores, oligonucleotídeo ou sonda refere-se a polímeros contendo purina e pirimidina, naturais ou modificados, de qualquer comprimento, sejam polirribonucleotídeos ou polidesoxir-ribonucleotídeos ou mistura polirribo-polidesoxirribo nucleotídeos e formas α -anoméricas do mesmo. Dois ou mais polímeros contendo purina e pirimidina são tipicamente ligados por uma ligação fosfoéster ou seu análogo. Os termos podem ser utilizados indiferentemente para se referir a todas as formas de ácido nucleico, incluindo o ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Os ácidos nucléicos podem ser vertente individual, dupla ou triplex, linear ou circular. Ácidos nucleicos incluem DNA genômico e cDNA. RNA de ácido nucleico pode ser cortado ou não cortado RNAm, RNAr, RNAt ou anti-sentido. Os ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente incluem, sintético, bem como os análogos de nucleotídeos e seus derivados.

[0109] Como resultado da degenerescência do código genético, as moléculas de ácidos nucleicos que incluem sequências degeneram em relação a moléculas de ácido nucleico que codificam as sequências de peptídeos da invenção. Assim, as sequências de ácido nucleico degeneradas que codificam as sequências de peptídeos, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos aqui exemplificados (por exemplo, sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), são fornecidos. O termo "complementar", quando utilizado em referência a uma sequência de ácido nucleico, significa que as regiões mencionadas são 100%

complementares, isto é, exibem 100% de emparelhamento de base sem incompatibilidades.

[0110] O ácido nucleico pode ser produzido utilizando qualquer uma variedade de padrão de clonagem e métodos de síntese química conhecidos e pode ser alterado intencionalmente por mutagênese dirigida ao local ou outras técnicas recombinantes conhecidas de um perito na arte. Pureza de polinucleotídeos pode ser determinada através de sequenciamento, eletroforese em gel, espectrometria de UV.

[0111] Os ácidos nucleicos podem ser inseridos em uma construção de ácido nucleico, em que a expressão do ácido nucleico é influenciada ou regulada por um "elemento de controle de expressão", aqui referido como um "cassete de expressão". O termo "elemento de controle de expressão" refere-se a um ou mais elementos da sequência de ácido nucleico que regulam ou influenciam a expressão de uma sequência de ácido nucleico ao qual está ligado operacionalmente. Um elemento de controle de expressão pode incluir, conforme apropriado, promotores, potenciadores, terminadores de transcrição, silenciadores de genes, um códon de início (por exemplo, ATG) na frente de um gene que codifica proteína, etc.

[0112] Um elemento de controle de expressão operativamente ligado a uma sequência de ácido nucleico controla a transcrição e, quando adequado, a tradução da sequência de ácido nucleico. O termo "ligado operacionalmente" refere-se a uma justaposição em que os componentes referidos estão numa relação que lhes permite funcionar no seu modo pretendido. Tipicamente, os elementos de controle de expressão são

justapostos nas extremidades 5' ou 3' dos genes, mas também pode ser intrônica.

[0113] Os elementos de controle de expressão incluem elementos que ativam a transcrição de forma constitutiva, que são induzíveis (isto é, requere um sinal externo ou estímulos de ativação), ou inativação (isto é, requer um sinal para desativar a transcrição, quando o sinal não está mais presente, transcrição é ativada ou "desativada"). Também incluído nos cassetes de expressão da presente invenção estão elementos de controle suficientes para tornar a expressão de genes controlável para tipos de células ou tecidos (por exemplo, elementos de controle específicos do tecido) específicas. Tipicamente, tais elementos estão localizados a montante ou a jusante (isto é, 5' e 3') da sequência de codificação. Os promotores são geralmente posicionados a 5' da sequência de codificação. Os promotores produzidos por DNA recombinante ou técnicas de síntese podem ser utilizados para proporcionar a transcrição dos polinucleotídeos da invenção. Um "promotor" normalmente significa um elemento de uma sequência mínima suficiente para transcrição direta.

[0114] Os ácidos nucleicos podem ser inseridos dentro de um plasmídeo para a transformação em uma célula hospedeira e para subsequente expressão e/ou manipulação genética. Um plasmídeo é um ácido nucleico que pode ser estavelmente propagado numa célula hospedeira; plasmídeos podem, opcionalmente, conter os elementos de controle da expressão, a fim de dirigir a expressão do ácido nucleico. Para os fins desta invenção, um vetor é sinônimo de um plasmídeo. Plasmídeos e vetores geralmente contêm pelo menos uma origem de replicação para a

propagação de uma célula e um promotor. Os plasmídeos e os vetores também podem incluir um elemento de controle de expressão para a expressão numa célula hospedeira, e são, portanto, úteis para a expressão e/ou a manipulação genética dos ácidos nucleicos que codificam sequências de peptídeos, que expressam as sequências de peptídeos em células hospedeiras e organismos (por exemplo, um paciente em necessidade de tratamento) ou a produção de sequências de peptídeos, por exemplo.

[0115] Tal como aqui utilizado, o termo "transgene" designa um polinucleotídeo que tenha sido introduzido numa célula ou organismo por artifício. Por exemplo, uma célula tendo um transgene, o transgene foi introduzido por manipulação genética ou "transformação" da célula. Uma célula ou progenia em que o transgene foi introduzido é referida como uma "célula transformada" ou "transformante". Tipicamente, o transgene está incluído na progenitura do transformante ou torna-se uma parte do organismo que se desenvolve a partir da célula. Os transgenes podem ser inseridos no DNA cromossômico ou mantidos como um plasmídeo auto-replicante, YAC, minicromossomo ou semelhantes.

[0116] Promotores do sistema bacteriano incluem T7 e promotores indutíveis tais como pL do bacteriófago λ, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) e promotores que respondem a tetraciclina. Os promotores do sistema de células de inseto incluem promotores constitutivos ou induzíveis (por exemplo, de ecdisona). Promotores constitutivos celulares de mamíferos incluem SV40, RSV, vírus do papiloma bovino (BPV) e outros promotores de vírus ou promotores indutíveis derivados

do genoma de células de mamíferos (por exemplo, promotor de metalotioneína IIA; promotor de choque térmico) ou de vírus de mamíferos (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus, repetição terminal longa do vírus do tumor mamário de rato induzível). Alternativamente, o genoma retroviral pode ser geneticamente modificado para introduzir e dirigir a expressão de uma sequência de peptídeos em células hospedeiras apropriadas.

[0117] Como os métodos e usos da presente invenção incluem a distribuição *in vivo*, os sistemas de expressão incluem ainda vetores desenhados para o uso *in vivo*. Exemplos não-limitativos particulares incluem vetores adenovirais (Patentes U.S. No. 5.700.470 e 5.731.172), vetores adeno-associados (Patente U.S. No. 5.604.090), vetores de vírus herpes simplex (Patente U.S. No. 5.501.979), vetores retrovirais (Patente U.S. No. 5.624.820, 5.693.508 e 5.674.703), vetores BPV (Patente U.S. No. 5.719.054), vetores de CMV (Patente U.S. No. 5.561.063) e vetores parvovírus, rotavírus, vírus de Norwalk e lentivirais (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 6.013.516). Os vetores incluem aqueles que distribuem genes às células do trato intestinal, incluindo as células estaminais (Croyle et al., *Gene Ther.* 5:645 (1998); S.J. Henning, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 17:341 (1997), U.S. Patent Nos. 5,821,235 e 6,110,456). Muitos destes vetores têm sido aprovados para estudos em humanos.

[0118] Os vetores de levedura incluem promotores constitutivos e induzíveis (ver, por exemplo, Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Cap. 13, ed, Greene Publish Assoc & Wiley Interscience, 1988; Grant et

al. *Methods in Enzymology*, 153:516 (1987), eds. Wu & Grossman; Bitter *Methods in Enzymology*, 152:673 (1987), eds Berger & Kimmel, Acad Press, N.Y.; e, Strathern et al., The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (1982) eds. Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II). Um promotor de levedura constitutivo como ADH ou LEU2 ou um promotor de indução, como GAL pode ser usada (R. Rothstein In: DNA Cloning, A Practical Approach, Vol.11, Ch. 3, ed. D.M. Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986). Os vetores que facilitam a integração das sequências de ácidos nucleicos estranhos no cromossoma de levedura, através de recombinação homóloga, por exemplo, são conhecidos na arte. Cromossomas artificiais de levedura (YAC) são tipicamente utilizados quando os polinucleotídeos inseridos são demasiado grandes para os vetores mais convencionais (por exemplo, superior a cerca de 12 Kb).

[0119] Os vetores de expressão também podem conter um marcador selecionável que confere resistência a uma pressão seletiva ou marcador identificável (por exemplo, betagalactosidase), permitindo assim que as células com o vetor sejam selecionadas para cultivo e expandidas. Alternativamente, um marcador selecionável pode ser um segundo vetor co-transfetado para uma célula hospedeira com um primeiro vetor contendo um ácido nucleico que codifica uma sequência de peptídeos. Sistemas de seleção incluem, mas não estão limitados ao vírus herpes simplex do gene da timidina-cinase (Wigler et al., *Cell* 11:223 (1977)), gene da hipoxantina-guanina (Szybalska et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)) e genes da adenina-fosforribosiltransferase (Lowy et al., *Cell* 22:817 (1980)))

que podem ser empregues em células tk-, hgprt- ou aprt-, respectivamente. Além disso, a resistência anti-metabólito pode ser utilizada como a base de seleção para *dhfr*, que confere resistência ao metotrexato (O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); o gene *gpt*, que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); gene da neomicina, que confere resistência ao aminoglicosídeo G-418 (Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)); puromicina; e gene da higromicina, que confere resistência à higromicina (Santerre et al., *Gene* 30:147 (1984)). Genes selecionáveis adicionais incluem o *trpB*, que permite que as células utilizem indol em vez de triptofano; *hisD*, que permite que as células utilizem histinol em vez de histidina (Hartman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047 (1988)) e ODC (ornitina descarboxilase), que confere resistência ao inibidor da ornitina-descarboxilase, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue (1987) In: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory).

[0120] De acordo com a invenção, são proporcionadas célula(s) transformada(s) (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*) e células hospedeiras que produzem uma variante ou fusão de FGF19 e/ou FGF21 como aqui estabelecido, onde a expressão de uma variante ou fusão de FGF19 e/ou FGF21 é conferida por um ácido nucleico que codifica a variante ou fusão de FGF19 e/ou FGF21. Células transformadas e hospedeiras que expressam as sequências de peptídeos da invenção incluem tipicamente um ácido nucleico que codifica a sequência de peptídeo invenção. Numa forma de realização, uma célula transformada ou

hospedeira é uma célula procariótica. Numa outra forma de realização, uma célula transformada ou hospedeira é uma célula eucariótica. Em vários aspectos, a célula eucariótica é uma célula de levedura ou mamífero (por exemplo, humano, primata, etc.).

[0121] Tal como aqui utilizado, uma célula "transformada" ou "hospedeira" é uma célula na qual um ácido nucleico é introduzido, que pode ser propagado e/ou transcrito para a expressão de uma sequência de peptídeos codificada. O termo inclui também qualquer descendência ou subclones da célula hospedeira.

[0122] As células hospedeiras e transformadas incluem, mas não estão limitadas a microorganismos, tais como bactérias e leveduras e plantas, insetos e células de mamíferos. Por exemplo, as bactérias transformadas com o ácido nucleico recombinante de vetores de expressão de bacteriófago, plasmídeo ou ácido nucleico cosmídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura recombinante, sistemas de células vegetais infectadas com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, vírus do mosaico da couve flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vetores recombinantes de expressão de plasmídeo (por exemplo, plasmídeo Ti), sistemas de células de insetos infectados com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, baculovírus) e os sistemas de células animais infectadas com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, retrovírus, adenovírus, vírus vaccinia) ou sistemas de células de animais transformados modificados para a propagação ou expressão transitória ou estável.

[0123] Para usos e métodos de terapia genética, uma célula transformada pode ser de um paciente. Uma célula de um paciente pode ser transformada com um ácido nucleico que codifica uma sequência de peptídeo invenção como aquela estabelecida *in vivo*. Em alternativa, uma célula pode ser transformada *in vitro* com um transgene ou um polinucleotídeo, e, em seguida transplantada para um tecido do paciente, a fim de efetuar o tratamento. Alternativamente, células primárias isoladas ou de uma linha de células estabelecidas podem ser transformadas com um transgene ou um polinucleotídeo que codifica uma variante de FGF19 e/ou FGF21 ou uma fusão/sequência quimérica (ou variante) do mesmo, tal como uma sequência de peptídeo quimérico, incluindo toda ou uma porção de FGF19 ou incluindo a totalidade ou uma porção de FGF21 e em seguida, opcionalmente, transplantadas para um tecido de um paciente.

[0124] Células-alvo não-limitantes para a expressão de sequências de peptídeos, em particular para a expressão *in vivo*, incluem células do pâncreas (células ilhotas), células musculares, células das mucosas e células endócrinas. Tais células endócrinas podem proporcionar a produção indutível (secreção) de uma variante de FGF19 e/ou FGF21 ou uma fusão/sequência quimérica (ou variante) do mesmo, tal como uma sequência de peptídeo quimérico, incluindo toda ou uma porção de FGF19 ou incluindo todas ou uma porção de FGF21. As células adicionais para transformar incluem células estaminais ou outras células multipotentes ou pluripotentes, por exemplo, as células progenitoras se diferenciam em várias células do pâncreas (células ilhotas), células musculares, células das

mucosas e células endócrinas. Segmentação das células estaminais fornece expressão de longo prazo de sequências de peptídeos da invenção.

[0125] Tal como aqui utilizado, o termo "cultura", quando utilizado em referência a uma célula, significa que a célula é cultivada *in vitro*. Um exemplo particular de tal célula é uma célula isolada a partir de um paciente e cultivada ou adaptada para crescimento em cultura de tecidos. Outro exemplo é uma célula geneticamente manipulada, *in vitro* e transplantada de volta para o mesmo tipo ou um paciente diferente.

[0126] O termo "isolado", quando utilizado em referência a uma célula, significa que uma célula é separada a partir do seu ambiente natural *in vivo*. Células "cultivadas" e "isoladas" podem ser manipuladas pela mão do homem, tais como geneticamente transformada. Estes termos incluem toda a descendência das células, incluindo as células descendentes que podem não ser idênticas à célula parental, devido a mutações que ocorrem durante a divisão celular. Os termos não incluem um ser humano completo.

[0127] Ácidos nucleicos que codificam sequências de peptídeos da invenção podem ser introduzidos para a expressão estável em células de um organismo inteiro. Tais organismos, incluindo animais transgênicos não humanos, são úteis para estudar o efeito da expressão de peptídeos em todo um animal e o benefício terapêutico. Por exemplo, como aqui descrito, a produção de uma variante de FGF19 e/ou FGF21 ou uma fusão/sequência quimérica (ou variante) do mesmo, tal como uma sequência de peptídeo quimérico, incluindo toda ou uma porção de FGF19 ou incluindo a totalidade ou uma porção de FGF21 como

aqui estabelecido, em ratos glicose reduzido e é antidiabética.

[0128] Estirpes de ratos que se desenvolvem ou que são susceptíveis ao desenvolvimento de uma doença em particular (por exemplo, diabetes, desordens degenerativas, câncer, etc) também são úteis para a introdução de proteínas terapêuticas, tal como aqui descrito, a fim de estudar o efeito da expressão da proteína terapêutica do rato suscetível à doença. Modelos transgênicos e animais genéticos que são suscetíveis à doença em particular ou em condições fisiológicas, como ratos diabéticos (STZ) induzidos por estreptozotocina (STZ), são metas adequadas para expressar as variantes de FGF19 e/ou FGF21, fusões/sequências quiméricas (ou variante) destes, tais como uma sequência de peptídeo quimérico, incluindo toda ou uma porção de FGF19 ou incluindo a totalidade ou uma porção de FGF21, como aqui estabelecido. Assim, de acordo com a invenção, são proporcionados animais transgênicos não humanos que produzem uma variante de FGF19 e/ou FGF21 ou uma fusão/sequência quimérica (ou variante) do mesmo, tal como uma sequência de peptídeo quimérico, incluindo toda ou uma porção de FGF19 ou incluindo a totalidade ou uma porção de FGF21, a produção das quais não ocorre naturalmente no animal que é conferida por um transgene presente nas células somáticas ou germinais do animal.

[0129] O termo "animal transgênico" refere-se a um animal cujas células somáticas ou da linha germinal contém informação genética recebida, direta ou indiretamente, através de manipulação genética deliberada a nível subcelular, tal como por micro-injeção ou infecção com vírus recombinante. O termo

"transgênico" inclui ainda as células ou tecidos (por exemplo, "célula transgênica", "tecido transgênico") obtidos a partir de um animal transgênico geneticamente manipulado, como aqui descrito. No presente contexto, um "animal transgênico" não abrange animais produzidos por cruzamento clássico ou de fertilização *in vitro*, mas indica animais nos quais uma ou mais células recebem uma molécula de ácido nucleico. Animais transgênicos da invenção podem ser heterozigóticos ou homozigóticos no que respeita ao transgene. Métodos para produzir animais transgênicos, incluindo ratos, ovelhas, porcos e sapos são bem conhecidos na arte (ver, por exemplo, Patente U.S. N°s 5.721.367, 5.695.977, 5.650.298 e 5.614.396) e, como tal, estão adicionalmente incluídos.

[0130] As sequências de peptídeos, ácidos nucleicos que codificam para as sequências de peptídeos, vetores e células hospedeiras transformadas que expressam as sequências de peptídeos incluem as formas isoladas e purificadas. O termo "isolado", quando utilizado como um modificador de uma composição da invenção, significa que a composição é separada, substancialmente completa ou pelo menos em parte, a partir de um ou mais componentes de um ambiente. Geralmente, as composições que existem na natureza, quando isolados, são substancialmente isentas de um ou mais materiais com que normalmente se associam com a natureza, por exemplo, uma ou mais proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos ou membrana celular. O termo "isolado" não exclui formas físicas alternativas da composição, tais como as variantes, modificações ou formas derivadas, fusões e quimeras, multimeros/oligômeros, etc., ou formas expressas em células

hospedeiras. O termo "isolado" também não exclui formas (por exemplo, composições farmacêuticas, composições de combinação, etc.), em que nelas existem combinações, qualquer um dos quais é produzido pela mão do homem.

[0131] Uma composição "isolada" também pode ser "purificada" quando livre de alguns, um número substancial de ou a maioria ou a totalidade de um ou mais outros materiais, tais como um contaminante ou uma substância ou material indesejado. As sequências de peptídeos da invenção geralmente não são conhecidas ou acredita-se que existem na natureza. No entanto, para uma composição que não existe na natureza, uma composição isolada será geralmente livre de alguns, um número substancial de ou a maioria ou todos os outros materiais com os quais tipicamente associa na natureza. Assim, uma sequência de peptídeo isolado, que também ocorre na natureza, não inclui polipeptídeos ou polinucleotídeos presentes entre milhões de outras sequências, tais como as proteínas de uma biblioteca de proteínas ou ácidos nucleicos de uma biblioteca genômica ou de DNAc, por exemplo. Uma composição "purificada" inclui combinações com uma ou mais outras moléculas inativas ou ativas. Por exemplo, uma sequência de peptídeo da presente invenção combinada com outro fármaco ou agente, tal como um fármaco de redução da glicemia ou agente terapêutico, por exemplo.

[0132] Tal como aqui utilizado, o termo "recombinante", quando utilizado como um modificador de sequências de peptídeos, ácidos nucleicos que codificam as sequências de peptídeos, etc., significa que as composições têm sido manipuladas (isto é, pela engenharia) de uma forma que

normalmente não ocorre na natureza (por exemplo, *in vitro*). Um exemplo específico de um peptídeo recombinante seria onde uma sequência de peptídeo da invenção é expressa por uma célula transfectada com um ácido nucleico que codifica a sequência de peptídeo. Um exemplo específico de um ácido nucleico recombinante seria em que um ácido nucleico (por exemplo, DNA genómico ou DNAc) que codifica uma sequência de peptídeo clonado num plasmídeo, com ou sem 5', 3' ou regiões de íntrons que o gene é normalmente contíguo no genoma do organismo. Outro exemplo de um peptídeo recombinante ou ácido nucleico é um híbrido ou uma sequência de fusão, tal como uma sequência de peptídeo quimérico que compreende uma porção de FGF19 e uma porção de FGF21.

[0133] De acordo com a invenção, são fornecidas composições e misturas de sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificados (incluindo variantes e subsequências de FGF19 e FGF21 listados nas Tabelas 1 a 8 e na Figura 1 fornecidas e as fusões e quimeras de FGF19/FGF21 listados nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1). Em uma forma de realização, uma mistura inclui uma ou mais sequências de peptídeos e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Numa outra forma de realização, uma mistura inclui uma ou mais sequências de peptídeos e uma droga ou agente terapêutico adjunto, como um agente anti-diabético ou fármaco ou agente terapêutico de redução da glicemia. Exemplos de drogas e agentes terapêuticos são apresentados a seguir. As combinações, tais como uma ou mais sequências de peptídeos em um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável, com uma

ou mais droga antidiabética ou droga de redução da glicemia ou agente terapêutico também são fornecidos. Tais combinações de sequência de peptídeos da invenção com outro fármaco ou agente, tal como um fármaco de redução da glicemia ou agente terapêutico, por exemplo, são úteis de acordo com os métodos e usos da invenção, por exemplo, para o tratamento de um paciente.

[0134] As combinações também incluem a incorporação de sequências de peptídeos ou ácidos nucleicos da invenção em partículas ou substâncias poliméricas, tais como os poliésteres, carboidratos, ácidos de poliamina, hidrogel, polivinilpirrolidona, acetato de etileno-vinila, metilcelulose, carboximetilcelulose, sulfato de protamina ou copolímeros lactídeo/glicólido, copolímeros de polilactídeo/glicólido ou copolímeros de etilenovinilacetato; aprisionamento em microcápsulas preparadas por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, através do uso de microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina ou poli (microcápsulas de metilmetacrolato), respectivamente; incorporação sistemas de liberação e dispersão no colóide da droga, tais como complexos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, contas e sistemas baseados em lipídeos (por exemplo, grupos acil N-gordos, tais como o N-lauroil, N-oleoil, aminas gordas, tais como amina de dodecil, amina de oleoílo, etc., ver Patente U.S. No. 6.638.513), incluindo emulsões de óleo-em-água, micelas, micelas mistas e lipossomas, por exemplo.

[0135] Peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos

exemplificados (incluindo as variantes e subsequências FGF19 e FGF21 listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1 e as fusões e quimeras FGF19/FGF21 listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1) como aqui estabelecido podem ser utilizados para modular o metabolismo de glicose e facilitar o transporte de glicose do sangue para os órgãos metabólicos, tais como o músculo, fígado e tecido adiposo. Tais sequências de peptídeos podem ser produzidas em quantidades suficientes ou eficazes para restaurar a tolerância à glicose e/ou para melhorar ou proporcionar a homeostase normal da glicose.

[0136] Tal como aqui divulgado, a administração de várias sequências de peptídeos variantes e fusão de FGF19 e FGF21 com ratos reduziu com sucesso os níveis de glicose. Além disso, em contraste com o FGF19, certas sequências de peptídeo não estimulam ou induzem a formação de HCC ou tumorigênese em ratos. Assim, a administração dos peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificados (incluindo as variantes e subsequências de FGF19 e FGF21 listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1 e as fusões e quimeras de FGF19/FGF21 listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), num animal, quer direta ou indiretamente métodos *in vivo* ou *ex vivo* (por exemplo, a administração da variante de fusão ou peptídeo, um ácido nucleico que codifica a variante ou peptídeo de fusão ou uma célula transformada ou vetor de terapia gênica que expressa a variante ou fusão de peptídeo), pode ser usada para tratar várias doenças.

[0137] Consequentemente, a invenção inclui *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (por exemplo, sobre ou em um paciente) métodos e

usos. Esses métodos e usos podem ser praticados com qualquer das sequências de peptídeos da invenção aqui estabelecidos.

[0138] De acordo com a invenção, são proporcionados métodos de tratamento de um paciente possuindo ou em risco de ter uma desordem. Em várias formas de realização, um método inclui a administração de uma sequência de peptídeo, tal como uma variante, fusão ou quimera de FGF19 ou FGF21 listadas nas Tabelas 1 a 8 e na Figura 1 ou uma subsequência, uma variante ou uma forma modificada de uma variante, fusão ou quimera de FGF19 ou FGF21 listados nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1 a um paciente numa quantidade eficaz para tratar o distúrbio.

[0139] Exemplos de desordens tratáveis, preveníveis e semelhantes com os peptídeos da invenção e métodos e usos, incluem doenças e distúrbios metabólicos. Exemplos não limitantes de doenças e distúrbios incluem: 1. Distúrbios do uso de glicose e sequelas que lhe estão associados, incluindo diabetes mellitus (tipo I e tipo-2), diabetes gestacional, hiperglicemia, resistência à insulina, metabolismo da glicose anormal, "pré-diabetes" (glicemia de jejum prejudicada (IFG) ou intolerância à glicose (IGT)), e outras desordens fisiológicas associadas com ou resultantes de condições hiperglicêmicas, incluindo, por exemplo, mudanças histopatológicas tal como a destruição das células β pancreática. Para o tratamento, as sequências de peptídeos da invenção podem ser administradas a pacientes que têm uma glicose no plasma em jejum (FPG) em nível superior a cerca de 100 mg/dl. As sequências de peptídeos da invenção podem também ser úteis em outras doenças relacionadas a hiperglicêmicos, incluindo danos nos rins (por exemplo, danos túbulo ou

nefropatia), degeneração do fígado, lesões oculares (por exemplo, retinopatia diabética ou cataratas) e desordens do pé diabético; 2. Dislipidemias e suas sequelas, tais como, por exemplo, a aterosclerose, a doença das artérias coronárias, doenças cerebrovasculares e semelhantes; 3. Outras condições que podem ser associadas à síndrome metabólica, como obesidade e massa corporal elevada (incluindo as condições co-mórbidas dos mesmos, tais como, mas não limitados a, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), esteatose hepática não alcoólica (NASH) e síndrome do ovário policístico (SOP)) e também incluem tromboses, estados de hipercoagulabilidade e pró-trombóticos (arteriais e venosos), hipertensão, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca; 4. Distúrbios ou condições em que as reações inflamatórias estão envolvidas, incluindo a aterosclerose, doenças intestinais inflamatórias crônicas (por exemplo, doença de Crohn e colite ulcerativa), asma, lúpus eritematoso, artrite ou outras desordens inflamatórias reumáticas; 5. Distúrbios de processos do ciclo celular ou diferenciação celular, tais como tumores de células adiposas, carcinomas lipomatosos, incluindo, por exemplo, lipossarcoma, tumores sólidos e doenças neoplásicas; 6. As doenças neurodegenerativas e/ou desordens do sistema nervoso central e periférico e/ou de doenças neurológicas que envolvem processos neuroinflamatórios e/ou outras neuropatias periféricas, incluindo a doença de Alzheimer, esclerose múltipla, doença de Parkinson, leucoencefalopatia multifocal progressiva e síndrome de Guillain-Barre; 7. Distúrbios da pele e/ou doenças de processos de cicatrização de feridas, incluindo dermatoses

eritêmato-escamosas e 8. Outras doenças como síndrome X, osteoartrite e síndrome da angústia respiratória aguda.

[0140] Tal como aqui utilizado, o termo "hiperglicêmico" ou "hiperglicemia", quando utilizado em referência a uma condição de um paciente, um nível anormalmente elevado transitório ou crônico de glicose presente no sangue de um paciente. A condição pode ser causada por um atraso no metabolismo da glicose ou de absorção, de tal modo que o paciente apresenta intolerância à glicose ou um estado de elevada glicose não normalmente encontrados em pacientes normais (por exemplo, em pacientes pré-diabéticos, intolerantes à glicose em risco de desenvolver diabetes ou em pacientes diabéticos). Glicose no plasma em jejum (FPG), níveis de normoglicemia são menos do que cerca de 100 mg/dl, para o metabolismo de glicose deficiente, entre cerca de 100 e 126 mg/dl e para os diabéticos maiores do que cerca de 126 mg/dl.

[0141] Tal como aqui descrito, a invenção inclui métodos de prevenção (por exemplo, em pacientes com predisposição para ter um distúrbio(s) específico(s)), atrasando, retardando ou inibindo a progressão, no início de ou tratamento (por exemplo, melhorando) obesidade ou uma massa corporal indesejável (por exemplo, índice de massa corporal maior do que o normal ou "IMC" em relação a um paciente apropriado combinado de idade comparável, sexo, raça, etc.). Assim, em várias formas de realização, um método da invenção para, por exemplo, o tratamento da obesidade ou de uma massa corporal indesejável (incluindo as condições co-mórbidas da obesidade, como por exemplo, apneia do sono obstrutiva, artrite, câncer (por exemplo, da mama, do endométrio e cólon), cálculos biliares ou

hiperglicemia, inclui o contato ou a administração de um peptídeo da invenção, tal como definido aqui (por exemplo, uma variante ou fusão de FGF19 e/ou FGF21 como definido nas Tabelas 1 a 8 ou na Figura 1, por exemplo) numa quantidade eficaz para tratar a obesidade ou uma massa corporal indesejável. Em aspectos particulares, um paciente tem um índice de massa corporal superior a 25, por exemplo, 25 a 30, 30 a 35, 35 a 40 ou maior do que 40.

[0142] Além disso, a invenção inclui métodos de prevenção (por exemplo, em pacientes com predisposição para ter distúrbio(s) específico(s)), diminuindo ou inibindo a progressão, retardar o surgimento ou tratamento de níveis indesejados ou anormalmente elevada de LDL no soro/plasma, VLDL, colesterol ou triglicerídeos, os quais, por si só ou em combinação, pode levar, por exemplo, a formação de placas, estreitamento ou bloqueio dos vasos sanguíneos e aumento do risco de hipertensão, acidente vascular cerebral e doença arterial coronária. Estas perturbações podem ser devido a, por exemplo, a predisposição genética ou dieta, por exemplo.

[0143] O termo "paciente" refere-se a um animal. Normalmente o animal é um mamífero que se beneficiaria do tratamento com uma sequência de peptídeo da invenção. Exemplos particulares incluem os primatas (por exemplo, seres humanos), cães, gatos, cavalos, vacas, porcos e ovelhas.

[0144] Os pacientes incluem aqueles que têm uma doença, por exemplo, um transtorno hiperglicêmico, tais como diabetes ou pacientes que não têm a doença, mas podem estar em risco de desenvolver a doença, por exemplo, pacientes pré-diabéticos com níveis FPG superior a 100 mg/dl, por exemplo, entre cerca

de 100 e 126 mg/dl. Os pacientes em risco de desenvolver uma doença incluem, por exemplo, aqueles cuja dieta pode contribuir para o desenvolvimento de hiperglicemia aguda ou crônica (por exemplo, diabetes), massa corporal indesejável ou obesidade, bem como aqueles que podem ter uma história familiar ou predisposição genética para desenvolvimento de hiperglicemia aguda ou crônica ou de massa corporal indesejável ou obesidade.

[0145] Tal como aqui descrito, os métodos de tratamento incluem a contatar ou administrar um peptídeo da invenção, tal como definido aqui (por exemplo, uma variante ou fusão de FGF19 e FGF21 ou como definido nas Tabelas 1 a 8 ou na Figura 1, por exemplo) em uma quantidade eficaz para atingir o objetivo desejado ou resultar. Um tratamento que resulta em um objetivo desejado ou resultado inclui diminuir, reduzir ou prevenir a gravidade ou a frequência de um ou mais sintomas da condição do paciente, por exemplo, uma melhoria na condição do paciente ou um efeito "benéfico" ou "efeito terapêutico". Portanto, o tratamento pode aumentar ou reduzir ou impedir a gravidade ou a frequência de um ou mais sintomas da doença, estabilização ou inibir a progressão ou agravamento da doença, e em alguns casos, inverter a desordem, transitoriamente (por exemplo, para 1 a 6, 6 a 12 ou 12 a 24 horas), para médio prazo (por exemplo, 1 a 6, 6 a 12, 12 a 24 ou 24 a 48 dias) ou longo prazo (por exemplo, por 1 a 6, 6 a 12, 12 a 24, 24 a 48 semanas ou maior do que 24 a 48 semanas). Assim, no caso de um distúrbio hiperglicêmico, por exemplo, o tratamento pode diminuir ou reduzir a glicose no sangue, aumentar a tolerância à glicose, melhorar o metabolismo da glicose, fornecer a

homeostase normal da glicose, diminuir ou reduzir a resistência à insulina, diminuir ou reduzir os níveis de insulina ou diminuir, prevenir, melhorar ou reverter a síndrome metabólica ou uma alteração histopatológica associado com ou que resulta de distúrbio hiperglicêmico, tal como a diabetes.

[0146] Por exemplo, uma sequência de peptídeo, método ou uso pode diminuir ou reduzir a glicose em um ou mais pacientes com níveis de FPG superior a 100 mg/dl, por exemplo, entre cerca de 100 e 125 mg/dl ou maior do que 125 mg/dl, de cerca de 5 a 10%, 10 a 20%, 20 a 30% ou 30 a 50% ou mais, ou, por exemplo, a partir de maior do que 200 mg/dl e menos do que 200 mg/dl, mais de 150 mg/dl e menos do que 150 mg/dl, maior do que 125 mg/dl a menos do que 125 mg/dl, etc. Além disso, uma sequência de peptídeo, método ou uso pode diminuir ou reduzir a glicose, por exemplo, para pacientes com pré-diabetes ou para a diabetes (por exemplo, tipo 2) com níveis basais HbA1c maiores do que cerca de 5%, 6%, 7%, 8%, 9% ou 10%, em especial 5%, 6% ou 7%.

[0147] Exemplos não limitativos de uma melhoria de uma alteração histopatológica associada a uma condição hiperglicêmica incluem, por exemplo, diminuir, inibir, reduzir ou deter: a destruição ou degeneração de células do pâncreas (por exemplo, células-β), danos nos rins, tais como calcificação dos túbulos ou nefropatia, degeneração do fígado, lesões oculares (por exemplo, a retinopatia diabética, catarata), pé diabético, úlceras na mucosa, como a boca e gengivas, periodontite, excesso de sangramento, cicatrização lenta ou retardada de lesões ou feridas (por exemplo, que o

chumbo para carbúnculos diabéticos), infecções da pele e outras doenças cutâneas, doenças coronárias e cardiovasculares, doença vascular periférica, acidente vascular cerebral, dislipidemia, hipertensão, obesidade ou o risco de desenvolver qualquer um dos precedentes. Melhoria da massa corporal indesejável ou a obesidade pode incluir, por exemplo, uma redução de massa corporal (tal como refletido pelo IMC ou semelhantes) ou uma melhoria de uma patologia associada, tal como uma diminuição dos triglicerídeos, colesterol LDL ou VLDL, diminuição da pressão sanguínea, diminuição do espessamento da camada íntima do vaso sanguíneo ou diminuição do risco reduzido de doença cardiovascular ou acidente vascular cerebral, diminuição da frequência cardíaca em repouso, etc.

[0148] Uma “quantidade eficaz” ou uma “quantidade suficiente” para uso e/ou para o tratamento de um paciente refere-se a uma quantidade que proporciona, em doses únicas ou múltiplas, por si só ou em combinação com uma ou mais outras composições (agentes terapêuticos tal como uma droga ou tratamento de hiperglicemias), tratamentos, protocolos ou agentes de regimes de tratamento, uma resposta detectável de qualquer duração de tempo (transitório, médio ou longo prazo), um resultado desejado ou um benefício objetivo ou subjetivo para um paciente de qualquer grau mensurável ou detectável ou por qualquer duração de tempo (por exemplo, por horas, dias, meses, anos ou curado). Essas quantidades são geralmente eficazes para melhorar uma doença, ou um, vários ou todos os sintomas adversos, consequências ou complicações da doença, um grau mensurável, embora a redução ou inibição da progressão ou

agravamento da doença seja considerada um resultado satisfatório.

[0149] Tal como aqui utilizado, o termo "melhorar" significa uma melhoria na desordem do paciente, uma redução na severidade da doença ou uma inibição da progressão ou agravamento da doença (por exemplo, a estabilização da desordem). No caso de um distúrbio hiperglicêmico (por exemplo, diabetes, resistência a insulina, intolerância à glicose, síndrome metabólica, etc.), por exemplo, uma melhoria pode ser uma redução ou uma diminuição da glicose no sangue, redução na resistência à insulina, uma redução de glucagon, uma melhoria na tolerância à glicose ou metabolismo da glicose ou homeostase. Uma melhoria em um distúrbio hiperglicêmico também pode incluir a melhoria da função pancreática (por exemplo, inibir ou impedir a destruição de células-β/ilhota ou aumentar o número e/ou função das células-β), uma diminuição em uma patologia associada a ou resultante de doença, tais como uma melhoria na histopatologia de um tecido ou órgão afetado, como aqui estabelecidos. No caso da massa corporal indesejável ou obesidade, por exemplo, uma melhoria pode ser uma redução no ganho de peso, redução de massa corporal (tal como refletido na redução do IMC, por exemplo) ou uma melhoria na condição associada com a obesidade da massa corporal indesejada, por exemplo, como aqui estabelecido (por exemplo, redução ou diminuição de glicose no sangue, de triglicerídeos, colesterol LDL ou VLDL, diminuição da pressão sanguínea, diminuição do espessamento da camada íntima do vaso sanguíneo, etc.).

[0150] Um benefício terapêutico ou melhoria, portanto, não precisa ser ablação completa de qualquer um, a maioria ou todos os sintomas, complicações, consequências ou causas associadas ao distúrbio ou doença. Assim, um ponto final satisfatório é conseguido quando existe um prazo transiente, médio ou longo, a melhoria incremental na condição de um paciente ou a uma redução parcial na ocorrência, frequência, gravidade, progressão ou a duração, ou a inibição ou reversão de um ou mais sintomas adversos associados ou complicações ou consequências ou causas subjacentes, agravamento ou progressão (por exemplo, estabilização de um ou mais sintomas ou complicações da doença, distúrbio ou doença), da desordem ou da doença ao longo de um período de tempo (horas, dias, semanas, meses, etc.).

[0151] Assim, no caso de uma doença tratável por uma sequência de peptídeo da invenção, a quantidade de peptídeo suficiente para aliviar uma desordem irá depender do tipo, gravidade e da extensão ou a duração da doença, o efeito terapêutico ou resultado desejado e pode ser facilmente determinada pelo perito na arte. As quantidades apropriadas também irão depender do paciente individual (por exemplo, a biodisponibilidade dentro do paciente, sexo, idade, etc.) Por exemplo, uma restauração temporária ou parcial da homeostasia normal da glicose num paciente pode reduzir a quantidade de dosagem ou a frequência de injeção de insulina, embora a liberação completa de insulina não tenha resultado.

[0152] Uma quantidade eficaz pode ser determinada, por exemplo, por medição de um ou mais efeitos fisiológicos relevantes. Em um exemplo específico não limitativo, no caso

de uma condição hiperglicêmica, uma diminuição ou redução da glicose no sangue ou uma melhora no teste de tolerância à glicose pode ser usada para determinar se a quantidade de sequência de peptídeo da invenção, incluindo subsequências, variantes de sequências e formas modificadas das sequências de peptídeos (por exemplo, exemplificadas, sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1) é eficaz para tratar uma condição hiperglicêmica. Em outro exemplo não limitativo particular, uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para reduzir ou diminuir qualquer nível (por exemplo, um nível da linha de base) de FPG, em que, por exemplo, uma quantidade suficiente para reduzir o nível de FPG superior a 200 mg/dl para menos do que 200 mg/dl, uma quantidade suficiente para reduzir o nível de FPG entre 175 mg/dl e 200 mg/dl a menos do que o nível de pré-administração, uma quantidade suficiente para reduzir o nível de FPG entre 150 mg/dl e 175 mg/dl a menos do que o nível de pré-administração, uma quantidade suficiente para reduzir o nível de FPG entre 125mg/dl e 150mg/dl a menos do que o nível de pré-administração, e assim por diante (por exemplo, reduzindo os níveis de FPG a menos do que 125 mg/dl, a menos do que 120 mg/dl, a menos do que 115 mg/dl, a menos do que 110 mg/dl, etc.) No caso de os níveis de HbA1c, uma quantidade eficaz inclui uma quantidade suficiente para reduzir ou diminuir os níveis de mais do que cerca de 10% para 9%, em mais do que cerca de 9% a 8%, por mais do que cerca de 8% a 7%, por mais do que cerca de 7% a 6%, por mais do que cerca de 6% a 5%, e assim por diante. Mais particularmente, a redução ou a diminuição de níveis HbA1c por cerca de 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%, ou mais, é uma quantidade eficaz de acordo com a invenção. Em ainda outro exemplo particular não limitativo, no caso de massa corporal indesejável ou obesidade, uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para diminuir ou reduzir o índice de massa corporal (IMC) de um paciente, uma diminuição ou redução da glicose, uma redução ou redução nos níveis no soro/plasma de triglicerídeos, lipídeo, colesterol, ácidos gordos, LDL e/ou VLDL. Em ainda exemplos não limitativos mais particulares, a quantidade é uma quantidade suficiente para diminuir ou reduzir qualquer um dos parâmetros acima mencionados, por exemplo, cerca de 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% ou mais.

[0153] Os métodos e usos da invenção para tratamento de um paciente são aplicáveis para a profilaxia para evitar uma perturbação num paciente, tal como um distúrbio hiperglicêmico ou desenvolvimento de massa corporal indesejável ou obesidade. Alternativamente, os métodos e usos podem ser praticados durante ou após o tratamento de um paciente. Por exemplo, antes, durante ou após o tratamento de um paciente para reduzir a glicose utilizando insulina ou outro medicamento para redução da glicemia ou agente terapêutico, por exemplo, um método ou uso da invenção podem, por exemplo, uma sequência de peptídeo da invenção pode ser administrada ao paciente. Além disso, uma composição, tal como uma sequência de peptídeo da invenção, pode ser combinada com outro fármaco ou agente, tal como um fármaco de redução da glicemia ou agente terapêutico, por exemplo.

[0154] Assim, os métodos e usos da invenção para tratamento de um paciente podem ser praticados antes, substancialmente contemporaneamente com ou seguindo um outro tratamento e podem ser complementados com outras formas de terapia. Terapias complementares incluem outros tratamentos de redução de glicose, como a insulina, um potenciador de sensibilidade à insulina e outros tratamentos com drogas, uma mudança na dieta (baixo açúcar, gorduras, etc), cirurgia de perda de peso (redução do volume do estômago por bypass gástrico, gastrectomia), banda gástrica, balão gástrico, manga gástrica, etc. Por exemplo, um método ou uso da invenção para o tratamento de uma desordem hiperglicêmica ou resistência à insulina pode ser utilizado em combinação com outras drogas ou composições farmacêuticas que reduzem a glicose ou aumentam a sensibilidade à insulina em um paciente. Medicamentos para o tratamento de diabetes incluem, por exemplo, as biguanidas e as sulfoniluréias (por exemplo, tolbutamida, cloropropamida, aceto-hexamida, tolazamida, glibenclamida e glipizida), tiazolidinedionas (rosiglitazona, pioglitazona), análogos de GLP-1, inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), formulações de bromocriptina (por exemplo, sequestradores de ácidos biliares e de (por exemplo, colesevelam)), e insulina (bolus e análogos basais), metformina (por exemplo, cloridrato de metformina) com ou sem uma tiazolidinodiona (TZD) e inibidores de SGLT-2. Medicamentos supressores do apetite são terapias suplementares também bem conhecidos e podem ser utilizados em combinação com os métodos da invenção. Podem ser administrados antes, simultaneamente ou seguindo métodos da invenção e os usos.

[0155] As sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes de sequências e formas modificadas de sequências de peptídeos exemplificadas (sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e na Figura 1), podem ser formuladas numa unidade de dosagem ou forma de dosagem unitária. Em uma forma de realização particular, uma sequência de peptídeo está em uma quantidade eficaz para tratar um paciente com necessidade de tratamento, por exemplo, devido à hiperglicemias. Doses unitárias exemplares variam de cerca de 25 a 250, 250 a 500, 500 a 1000, 1000 a 2500 ou 2500 a 5000, 5000 a 25,000, 25,000 a 50,000 ng, a partir de cerca de 25 a 250, 250 a 500, 500 a 1000, 1000 a 2500 ou 2500 a 5000, 5000 a 25,000, 25,000 a 50,000 µg e de cerca de 25 a 250, 250 a 500, 500 a 1000, 1000 a 2500 ou 2500 a 5000, 5000 a 25,000, 25,000 a 50,000mg.

[0156] As sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes de sequências e formas modificadas de sequências de peptídeos exemplificados (sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1) podem ser administradas para proporcionar o efeito pretendido em dose única ou doses múltiplas, por exemplo, em uma quantidade eficaz ou suficiente. Doses exemplares variam de cerca de 25 a 250, 250 a 500, 500 a 1000, 1000 a 2500 ou 2500 a 5000, 5000 a 25,000, 25,000 a 50,000 pg/kg, a partir de cerca de 50 a 500, 500 a 5000, 5000 a 25,000 ou 25,000 a 50,000 ng/kg e de cerca de 25 a 250, 250 a 500, 500 a 1000, 1000 a 2500 ou 2500 a 5000, 5000 a 25,000, 25,000 a 50,000 µg/kg. Doses únicas ou múltiplas podem ser administradas, por exemplo, várias vezes por dia, em dias consecutivos, dias alternados, semanalmente ou intermitentemente (por exemplo, duas vezes por semana, uma vez

a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas ou uma vez a cada 2, 3, 4, 5 ou 6 meses).

[0157] As sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificados (sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), podem ser administradas e métodos podem ser praticados por administração sistêmica, regional ou local, por qualquer rota. Por exemplo, uma sequência de peptídeo pode ser administrada por via parentérica (por exemplo, por via subcutânea, intravenosa, intramuscular ou intraperitoneal), oralmente (por exemplo, ingestão, bucal ou sublingual), por inalação, por via intradérmica, intracavidade, intracraniana, transdérmica (tópica), transmucosa ou retal. As sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificados (sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1) e os métodos da invenção, incluindo composições farmacêuticas, podem ser administradas por meio de um sistema de liberação (micro)encapsulado ou embalados num implante para administração.

[0158] A invenção proporciona ainda "composições farmacêuticas" que incluem uma sequência de peptídeos (ou sequências) da invenção, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificadas (sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1), e um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis ou diluente fisiologicamente aceitável, veículo ou excipiente. Em determinadas formas de realização, uma sequência de peptídeo ou sequências estão presentes em uma quantidade

terapeuticamente aceitável. As composições farmacêuticas podem ser utilizadas em conformidade com os métodos e usos da invenção. Assim, por exemplo, as composições farmacêuticas podem ser administradas *ex vivo* ou *in vivo* a um paciente, de modo a praticar os métodos de tratamento e usos da presente invenção.

[0159] As composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas para ser compatíveis com o método pretendido ou a via de administração; vias exemplares de administração são aqui apresentadas. Além disso, as composições farmacêuticas podem ainda conter outros agentes terapeuticamente ativos ou compostos aqui revelados (por exemplo, agentes de redução de glicose) ou conhecidos dos peritos na arte que podem ser utilizados no tratamento ou prevenção de várias doenças e distúrbios, como aqui estabelecidos.

[0160] As composições farmacêuticas que compreendem, tipicamente, uma quantidade terapeuticamente eficaz de, pelo menos, uma das sequências de peptídeos da invenção, incluindo subsequências, variantes e formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificados (sequências listadas nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1) e um ou mais agentes de formulação farmacêutica e fisiologicamente aceitáveis. Os diluentes adequados, farmacêuticamente aceitáveis ou fisiologicamente aceitáveis, carreadores ou excipientes incluem, mas não estão limitados a, antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico e bissulfato de sódio), conservantes (por exemplo, álcool benzílico, parabenos de metila, etila ou n-propila, p-hidroxibenzoato), agentes emulsionantes, agentes de suspensão, agentes emulsionantes, solventes, enchimentos, agentes

encorpantes, tampões, veículos, diluentes e/ou adjuvantes de dispersão. Por exemplo, um veículo adequado pode ser uma solução salina fisiológica ou solução salina tamponada com citrato, possivelmente suplementado com outros materiais comuns em composições farmacêuticas para administração por via parentérica. Solução salina tamponada neutra ou salina misturada com albumina do soro são os veículos mais exemplares. Os peritos na arte reconhecerão facilmente uma variedade de tampões que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas e formas de dosagem utilizadas na invenção. Tampões típicos incluem, mas não estão limitados a ácidos farmacêuticamente aceitáveis fracos, bases fracas ou suas misturas. Componentes tampão incluem materiais solúveis em água, tais como ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido glutâmico e os seus sais.

[0161] Um solvente primário num veículo pode ser ou aquoso ou não aquoso na natureza. Além disso, o veículo pode conter outros excipientes farmacêuticamente aceitáveis para modificar ou manter o pH, osmolaridade, viscosidade, estabilidade ou esterilidade da composição farmacêutica. Em certas formas de realização, o veículo farmacêuticamente aceitável é um tampão aquoso. Em outras formas de realização, um veículo compreende, por exemplo, cloreto de sódio e/ou citrato de sódio.

[0162] As composições farmacêuticas da invenção podem conter ainda outros agentes de formulação farmacêuticamente aceitáveis para modificar ou manter a taxa de liberação de um peptídeo da invenção. Tais agentes de formulação incluem aquelas substâncias conhecidas por artesãos especializados na

preparação de formulações de liberação sustentada. Para mais referências relativas a agentes de formulação farmacêutica e fisiologicamente aceitáveis, ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) páginas 1435 a 1712, The Merck Index, 12^a ed. (1996, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ) e Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pensilvânia). As composições farmacêuticas adequadas adicionais para a administração são conhecidas na arte e são aplicáveis nos métodos e composições da invenção.

[0163] A composição farmacêutica pode ser armazenada em frascos para injetáveis estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou pó desidratado ou liofilizado. Tais composições podem ser armazenadas quer numa forma pronta para usar, uma forma liofilizada que requer a reconstituição antes do uso, uma forma líquida que requer diluição antes do seu uso ou outra forma aceitável. Em algumas formas de realização, uma composição farmacêutica é proporcionada em um recipiente de uso único (por exemplo, um frasco para uso único, ampola, seringa ou auto-injetor (semelhante a, por exemplo, um EpiPen®)), enquanto um recipiente multi-uso (por exemplo, um frasco multi-uso) é fornecido em outras formas de realização. Qualquer aparelho de distribuição de droga pode ser utilizado para liberar os peptídeos da invenção, incluindo os implantes (por exemplo, bombas implantáveis) e sistemas de catéter, sendo que ambos são conhecidos dos peritos na arte. Injeções de depósito, que são geralmente administrados por via subcutânea ou intramuscular, também podem ser utilizadas para

liberar os peptídeos da invenção durante um período de tempo definido. Injeções de depósito são geralmente sólidos ou à base de óleo e geralmente compreendem pelo menos um dos componentes da formulação aqui estabelecidos. O perito na arte está familiarizado com as possíveis formulações e usos de injeções de depósito.

[0164] A composição farmacêutica pode ser formulada para ser compatível com a sua via de administração pretendida. Assim, as composições farmacêuticas incluem carreadores, diluentes ou excipientes adequados para a administração por via parentérica, incluindo (por exemplo, por via subcutânea (sc), por via intravenosa, intramuscular ou intraperitoneal), intradérmica, oral (por exemplo, a ingestão), inalação, intracavidade, intracraniana e transdérmica (tópica).

[0165] As composições farmacêuticas podem estar na forma de uma solução aquosa injetável estéril ou suspensão oleaginosa. Esta suspensão pode ser formulada usando agentes dispersantes ou agentes molhantes adequados e agentes de suspensão aqui revelados ou conhecidos do especialista na técnica. A preparação injetável estéril pode também ser uma solução injetável estéril ou suspensão em um diluente parentericamente aceitável não-tóxico ou solvente, por exemplo, como uma solução em 1,3-butanodiol. Meios diluentes, solventes e meios de dispersão que podem ser empregues incluem água, solução de Ringer, solução de cloreto de sódio isotônica, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) ou salina tamponada com fosfato (PBS), etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietileno glicol líquido) e suas misturas adequadas. Além disso, os óleos fixos estéreis são convencionalmente

utilizados como um meio solvente ou de suspensão. Para este fim, qualquer óleo fixo brando pode ser empregue incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos. Além disso, ácidos gordos, tais como ácido oleico, encontram uso na preparação de injetáveis. Absorção prolongada de formulações injetáveis em particular pode ser obtida pela inclusão de um agente que retarda a absorção (por exemplo, monoestearato de alumínio ou gelatina).

[0166] As composições farmacêuticas podem estar numa forma adequada para uso oral, por exemplo, na forma de comprimidos, cápsulas, trociscos, pastilhas, suspensões aquosas ou oleosas, pós dispersíveis ou grânulos, emulsões, cápsulas duras ou moles ou xaropes, soluções, micropérolas ou elixires. As composições farmacêuticas destinadas ao uso oral podem ser preparadas de acordo com qualquer método conhecido na arte para a fabricação de composições farmacêuticas. Tais composições podem conter um ou mais agentes, tais como agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes corantes e agentes conservantes a fim de proporcionar preparações farmacêuticamente elegantes e saborosas. Os comprimidos que contêm um peptídeo da invenção podem ser misturados com excipientes farmacêuticamente aceitáveis não tóxicos adequados para a fabricação de comprimidos. Estes excipientes incluem, por exemplo, diluentes, tais como carbonato de cálcio, carbonato de sódio, lactose, fosfato de cálcio ou fosfato de sódio; agentes de granulação e de desintegração, por exemplo, amido de milho ou ácido algínico, agentes de ligação, por exemplo, amido, gelatina ou acácia e agentes lubrificantes, por exemplo, estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

[0167] Comprimidos, cápsulas e semelhantes adequados para administração oral podem ser não revestidos ou podem ser revestidos por técnicas conhecidas para retardar a desintegração e absorção no trato gastrointestinal e assim proporcionar uma ação sustentada durante um período mais longo. Por exemplo, um material de retardamento no tempo tal como monoestearato de glicerila ou diestearato de glicerila podem ser empregados. Eles também podem ser revestidos por técnicas conhecidas na arte para formar comprimidos terapêuticos osmóticos para liberação controlada. Agentes adicionais incluem partículas biodegradáveis ou biocompatíveis ou uma substância polimérica, como poliésteres, ácidos de poliamina, hidrogel, polivinilpirrolidona, polianidridos, ácido poliglicólico, etileno-acetato de vinila, metilcelulose, carboximetilcelulose, sulfato de protamina ou copolímeros de lactídeo/glicolídeo, copolímeros de polilactídeo/glicolídeo ou copolímeros de etilenovinilacetato, a fim de controlar o fornecimento de uma composição administrada. Por exemplo, o agente por via oral pode ser aprisionado em microcápsulas preparadas por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, pelo uso de hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina ou poli (microcápsulas de metilmacrolato), respectivamente, ou num sistema de administração de fármaco coloidal. Os sistemas de dispersão coloidais incluem complexos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, micropérolas e sistemas de base lipídica, incluindo emulsões óleo-em-água, micelas, micelas mistas e lipossomas. Os métodos para a preparação de tais formulações são conhecidos pelos peritos na arte e estão disponíveis comercialmente.

[0168] As formulações para uso oral podem também ser apresentadas como cápsulas de gelatina dura em que o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido inerte, por exemplo, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, caulino ou celulose microcristalina ou cápsulas de gelatina mole em que o ingrediente ativo é misturado com água ou um meio oleoso, por exemplo, óleo de amendoim, parafina líquida ou azeite de oliva.

[0169] As suspensões aquosas contêm os materiais ativos em mistura com excipientes adequados para a fabricação dos mesmos. Tais excipientes são agentes de suspensão, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose, hidroxi-propilmetylcelulose, alginato de sódio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto e goma acácia; dispersantes ou molhantes podem ser um fosfatídeo de ocorrência natural, por exemplo, lecitina ou produtos de condensação de um óxido de alquíleno com ácidos gordos, por exemplo, produtos de estearato de polioxietileno ou condensação de óxido de etíleno com álcoois alifáticos de cadeia longa, por exemplo, heptadecaetilenooxicetanol ou produtos de condensação de óxido de etíleno com ésteres parciais derivados de ácidos gordos e um hexitol, tal como monooleato de polioxietileno sorbitol ou produtos condensação de óxido de etíleno com ésteres parciais derivados de ácidos gordos e anidridos de hexitol, por exemplo, monooleato polietileno sorbitano. As suspensões aquosas também podem conter um ou mais conservantes.

[0170] As suspensões oleosas podem ser formuladas suspendendo o ingrediente ativo num óleo vegetal, por exemplo,

óleo de amendoim, óleo de oliva, óleo de sésamo ou óleo de coco ou num óleo mineral tal como parafina líquida. As suspensões oleosas podem conter um agente espessante, por exemplo, cera de abelha, parafina dura ou álcool cetílico. Agentes adoçantes tais como os estabelecidos acima e agentes aromatizantes podem ser adicionados para proporcionar uma preparação oral palatável.

[0171] Os pós e grânulos dispersáveis adequados para a preparação de uma suspensão aquosa pela adição de água proporcionam o ingrediente ativo em mistura com um agente dispersante ou molhante, agente de suspensão e um ou mais conservantes. Agentes dispersantes ou molhantes e agentes de suspensão apropriados são aqui exemplificados.

[0172] As composições farmacêuticas da invenção podem também estar na forma de emulsões de óleo-em-água. A fase oleosa pode ser um óleo vegetal, por exemplo, óleo de oliva ou óleo de amendoim ou um óleo mineral, por exemplo, parafina líquida ou misturas destes. Os agentes emulsionantes adequados podem ser gomas de ocorrência natural, por exemplo, goma arábica ou goma adragante; fosfatídeos que ocorrem naturalmente, por exemplo, feijão de soja, lecitina e ésteres ou ésteres parciais derivados de ácidos gordos; anidridos de hexitol, por exemplo, monooleato de sorbitano e os produtos de condensação de ésteres parciais com óxido de etileno, por exemplo, monooleato de polioxietileno sorbitano.

[0173] As composições farmacêuticas podem também incluir carreadores para proteger a composição contra a degradação rápida ou a eliminação do corpo, tais como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, lipossomas,

hidrogéis, pró-fármacos e sistemas de liberação microencapsulados. Por exemplo, um material de atraso de tempo tal como monoestearato de glicerila ou estearato de glicerila por si só ou em combinação com uma cera podem ser empregues. A absorção prolongada de composições farmacêuticas injetáveis pode ser conseguida através da inclusão de um agente que atrasa a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio ou gelatina. A prevenção da ação de microorganismos pode ser conseguida através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e outros semelhantes.

[0174] A invenção também inclui peptídeos da invenção sob a forma de supositórios para administração retal. Os supositórios podem ser preparados através da mistura de um peptídeo da invenção com um excipiente não irritante adequado, que é sólido a temperaturas normais, mas líquido à temperatura retal e por isso funde no reto para liberar o fármaco. Tais materiais incluem, mas não estão limitados a, manteiga de cacau e polietileno glicóis.

[0175] De acordo com a invenção, proporcionam-se métodos de identificação de um peptídeo (ou uma subsequência, variante ou forma modificada como aqui estabelecido) tendo atividade de redução da glicose sem atividade substancial carcinoma hepatocelular (HCC). Numa forma de realização, um método inclui: a triagem (por exemplo, o ensaio ou medição) de uma sequência de peptídeo (ou uma subsequência, variante ou forma modificada como aqui estabelecido) para a atividade de redução de glicose e o rastreio (por exemplo, o ensaio ou medição) de uma sequência de peptídeo (ou uma subsequência, variante ou

forma modificada como aqui estabelecido) para a atividade de HCC ou a expressão de um marcador que correlacione com atividade HCC. Um peptídeo com atividade de redução da glicemia e reduzida ou ausente atividade de HCC identifica assim o peptídeo. Em aspectos particulares, o marcador correlacionando com a atividade HCC compreende um perfil lipídico - um peptídeo que tem menor aumento de atividade de lipídeos em comparação com a FGF19 indica que o peptídeo tem atividade HCC ausente ou reduzida, ou o marcador correlacionando com atividade HCC compreende expressão de gene da aldo-ceto redutase - um peptídeo que regula para baixo ou diminui a expressão do gene aldo-ceto redutase em comparação com FGF19 indica que o peptídeo tem atividade HCC reduzida ou ausente, ou o marcador indicativo de atividade HCC compreende expressão gene Slc1a2 - um peptídeo que regula para cima ou aumenta expressão do gene Slc1a2 em comparação com FGF19 indica que o peptídeo tem atividade HCC reduzida ou ausente.

[0176] Os termos "ensaio" e "medição" e suas variações gramaticais dos mesmos são aqui usados indiferentemente e referem-se tanto determinações qualitativas ou quantitativas ou ambas determinações qualitativas e quantitativas. Quando os termos são usados em referência a detecção, quaisquer meios de avaliar a quantidade relativa são contemplados, incluindo os vários métodos descritos aqui e conhecidos na arte. Por exemplo, a expressão do gene pode ser ensaiada ou medida por uma transferência de *Northern*, transferência de *Western*, ensaio de imunoprecipitação ou medindo a atividade, função ou quantidade da proteína expressa (por exemplo, aldo-ceto redutase ou Slc1a2).

[0177] Fatores de risco para HCC, o tipo mais comum de câncer de fígado, incluem diabetes tipo 2 (provavelmente agravadas pela obesidade). O risco de HCC em diabéticos do tipo 2 é maior (a partir de ~2,5 a ~7 vezes o risco de não-diabéticos), dependendo da duração da diabetes e do protocolo de tratamento.

[0178] Várias metodologias podem ser utilizadas em rastreamento e diagnóstico de HCC e são bem conhecidos dos peritos na arte. Indicadores de HCC incluem a detecção de um fabricante de tumor, tais como elevados níveis de alfa-fetoproteína (AFP) ou des-gama carboxiprotrombina (DCP). Um número de diferentes técnicas de digitalização e imagem também são úteis, incluindo o ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética. Em relação à invenção, a avaliação de se um peptídeo (por exemplo, um peptídeo candidato) apresenta evidência de indução de HCC pode ser determinada *in vivo* por, por exemplo, quantificação da formação de nódulos HCC num modelo animal, tais como ratos *db/db*, administrado um peptídeo, comparado com a formação de nódulos HCC por FGF19 tipo selvagem. Macroscopicamente, câncer de fígado pode ser nodular, onde os nódulos tumorais (que são redondo-a-oval, cinza ou verde, bem circunscrito, mas não encapsulado) aparecem como uma grande massa ou várias massas menores. Alternativamente, HCC pode estar presente como um tumor infiltrativo que é difuso e mal circunscrito e, frequentemente, se infiltra nas veias do portal.

[0179] Avaliação patológica de amostras de tecido hepático é geralmente realizada após os resultados de uma ou mais das técnicas acima mencionadas indicarem a presença provável de

HCC. Assim, os métodos da invenção podem ainda incluir avaliação de uma amostra de tecido hepático de um modelo animal *in vivo* (por exemplo, um rato *db/db*) útil em estudos de HCC, a fim de determinar se uma sequência de peptídeo apresenta evidência de indução do carcinoma hepatocelular. Na avaliação microscópica, um patologista pode determinar se um dos quatro tipos de arquitetura e citológicos gerais (padrões) de HCC estão presentes (ou seja, fibrolamellar, pseudoglandular (adenóide), pleomórfico (células gigantes) e células claras).

[0180] A invenção também inclui a geração e uso de anticorpos e os seus fragmentos, que se ligam às sequências de peptídeos da invenção, incluindo variantes de sequências de subsequências e formas modificadas das sequências de peptídeos exemplificados (incluindo os peptídeos listados nas Tabelas 1 a 8 e Figura 1).

[0181] Tal como aqui utilizados, os termos "anticorpos" (Ab) e "imunoglobulinas" (Ig) se referem a glicoproteínas possuindo as mesmas características estruturais. Enquanto que os anticorpos exibem especificidade de ligação a um antígeno, as imunoglobulinas incluem tanto os anticorpos como outras moléculas semelhantes a anticorpos, que podem não ter a especificidade do antígeno.

[0182] O termo "anticorpo" inclui anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos bi específicos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos, e fragmentos de ligação de anticorpos, incluindo fragmentos Fab e F(ab)^{1,2}, desde que estes exibam a atividade biológica desejada. A unidade de base estrutural do anticorpo compreende um tetrâmero e cada

tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeo, tendo cada par uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" (cerca de 50 a 70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos primeiramente responsáveis pelo reconhecimento do antígeno. Em contraste, a porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante primeiramente responsável pela função efetora. Cadeias leves humanas são classificadas como cadeias leves kappa e lambda, ao passo que as cadeias pesadas humanas são classificadas como mu, delta, gama, alfa ou silon, e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgA e IgE, respectivamente. Fragmentos de ligação são produzidos por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Fragmentos de ligação incluem Fab, Fab', F(ab')₂, Fv e anticorpos de cadeia simples.

[0183] Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável (VH) seguido por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável numa extremidade (VL) e um domínio constante na sua outra extremidade, o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Nas cadeias leves e pesadas, as regiões variáveis e constantes são unidas por uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos com a cadeia pesada incluindo igualmente uma região "D" de cerca de mais 10 aminoácidos. Todas as cadeias de anticorpos apresentam a mesma estrutura geral de regiões de estrutura relativamente conservadas (FR) unidas por três

regiões hiper variável, também chamadas de regiões determinantes da complementaridade ou CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par estão alinhadas pelas regiões de estruturas, permitindo ligação a um epítopo específico. A partir de N-terminal para C-terminal, ambas as cadeias leves e pesadas compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4.

[0184] Um anticorpo intacto tem dois locais de ligação e, exceto nos anticorpos bifuncionais ou bi específicos, os dois locais de ligação são os mesmos. Um anticorpo bi específico ou bifuncional é um anticorpo híbrido artificial, tendo dois pares de cadeias pesadas/leves diferentes e dois sítios de ligações diferentes. Os anticorpos bi específicos podem ser produzidos por uma variedade de métodos, incluindo a fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'.

[0185] Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo monoclonal" se refere a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, anticorpos individuais que constituem a população são idênticos exceto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único local antigênico. Em contraste com preparações de anticorpos policlonais, que incluem diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno.

[0186] Um "anticorpo neutralizante" é uma molécula de anticorpo que é capaz de eliminar ou reduzir de forma

significativa uma função de efetor de um antígeno alvo ao qual se liga.

[0187] Fragmentos de ligação de anticorpos podem ser produzidos por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. A digestão de anticorpos com enzima papaina resulta em dois fragmentos de ligação ao antígeno idênticos, também conhecidas como fragmentos "Fab" e um fragmento "Fc", que não tem atividade de ligação ao antígeno. A digestão de anticorpos com enzima pepsina resulta em um fragmentos de $F(ab')_2$ em que os dois braços da molécula de anticorpo permanecem ligados e formam locais de ligação de dois抗ígenos. O fragmento de $F(ab')_2$ tem a capacidade de reticular o antígeno.

[0188] O termo "Fab" se refere a um fragmento de um anticorpo que comprehende o domínio constante da cadeia leve e o domínio CH1 da cadeia pesada. O termo "Fv", quando aqui utilizado, se refere ao fragmento mínimo de anticorpo que retém ambos os抗ígenos de reconhecimento e locais de ligação ao antígeno. Numa espécie Fv de duas cadeias, esta região consiste num dímero de domínio de uma cadeia pesada e uma variável de cadeia leve em associação não covalente. Numa espécie Fv de cadeia simples, um domínio de uma cadeia pesada e uma variável de cadeia leve pode ser covalentemente ligado por um ligante peptídico flexível, de tal modo que as cadeias leves e pesadas podem se associar numa estrutura "dimérica" análoga a este em espécie Fv de duas cadeias. É nesta configuração que os três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um local de ligação ao antígeno na superfície do dímero VH-VL. Enquanto os seis CDRs, em conjunto, conferem especificidade de ligação ao antígeno ao

anticorpo, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicos para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e se ligar ao antígeno.

[0189] O termo "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDRs" se refere a peças de receptores imunológicos que entram em contato com um ligante específico e determina a sua especificidade. O termo "região hiper variável" se refere aos resíduos de aminoácido de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hiper variável compreende geralmente resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDRs" e/ou os resíduos de uma "volta hiper variável".

[0190] Tal como aqui utilizado, o termo "epítopo" refere-se a sítios de ligação de anticorpos de抗原s de proteínas. Os determinantes epítópicos consistem normalmente em agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar, bem como três características estruturais e dimensionais de carga específicas. Um anticorpo se diz ligar a um antígeno quando a constante de dissociação é $\leq 1\mu M$, preferencialmente $\leq 100\mu M$ e mais preferencialmente $\leq 10\mu M$. Um aumento da constante de equilíbrio (" K_D ") significa que há menos de afinidade entre o epítopo e o anticorpo, ao passo que uma diminuição da constante de equilíbrio significa que existe uma maior afinidade entre o epítopo e o anticorpo. Um anticorpo com uma K_D de "não mais do que" uma certa quantidade significa que o anticorpo se liga ao epítopo com o dado K_D ou mais fortemente. Enquanto K_D descreve as características de ligação de um epítopo e um anticorpo, "potência" descreve a eficácia do

próprio anticorpo para uma função do anticorpo. Não existe necessariamente uma correlação entre a constante de equilíbrio e a potência, assim, por exemplo, um K_D relativamente baixo não significa automaticamente uma potência elevada.

[0191] O termo "liga-se seletivamente", em referência a um anticorpo, não significa que o anticorpo se liga apenas a uma única substância, mas sim que o K_D do anticorpo com uma primeira substância é menor do que a K_D do anticorpo para uma segunda substância. Um anticorpo que se liga exclusivamente a um epítopo se liga apenas a esse epítopo simples.

[0192] Quando administrados em humanos, os anticorpos que contêm regiões de roedor (murino ou rato) variáveis e/ou constantes são muitas vezes associadas com, por exemplo, depuração rápida a partir do corpo ou a geração de uma resposta imunológica por parte do corpo contra o anticorpo. A fim de evitar o uso de anticorpos derivados de roedores, os anticorpos totalmente humanos podem ser gerados por meio da introdução da função de anticorpo humano num roedor, de modo que o roedor produza anticorpos totalmente humanos. A menos que aqui especificamente identificados, anticorpos "humanos" e "completamente humanos" podem ser aqui utilizados indistintamente. O termo "plenamente humano" pode ser útil ao distinguir os anticorpos que são apenas parcialmente humanos daqueles que são completamente ou totalmente humanos. O especialista na técnica está ciente de diversos métodos de produção de anticorpos completamente humanos.

[0193] A fim de resolver as possíveis respostas, anticorpos humanos anti-rato, anticorpos quiméricos ou humanizados podem ser utilizados de outra forma. Os anticorpos quiméricos

possuem uma região constante humana e uma região variável de murino, e, como tal, as respostas de anticorpos anti-quiméricos humanos podem ser observadas em alguns pacientes. Por isso, é vantajoso proporcionar anticorpos totalmente humanos contra enzimas multiméricas a fim de evitar possível anticorpo humano anti-rato ou respostas de anticorpos anti-quiméricos humanos.

[0194] Os anticorpos monoclonais totalmente humanos podem ser preparados, por exemplo, através da geração de linhas celulares de hibridoma por técnicas conhecidas dos peritos na arte. Outros métodos de preparação envolvem o uso de sequências que codificam os anticorpos específicos para a transformação de uma célula hospedeira de mamífero adequada, tal como uma célula CHO. A transformação pode ser feita por qualquer método conhecido para introduzir polinucleotídeos numa célula hospedeira, incluindo, por exemplo, o empacotamento do polinucleotídeo num vírus (ou num vetor viral) e a transdução de uma célula hospedeira com o vírus (ou vetor) ou por procedimentos de transfecção conhecidos na arte. Os métodos para introduzir polinucleotídeos heterólogos em células de mamífero são bem conhecidos na arte e incluem transfecção mediada por dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, eletroporação, encapsulamento do polinucleotídeo (s) em lipossomas e microinjeção direta do DNA em núcleos. Linhas de células de mamíferos disponíveis como hospedeiros para a expressão são bem conhecidas na arte e incluem, mas não estão limitadas a, células CHO, células HeLa e células de carcinoma hepatocelular humano.

[0195] Os anticorpos podem ser utilizados para diagnóstico e/ou terapia. Por exemplo, os anticorpos podem ser utilizados como um diagnóstico através da detecção do nível de um ou mais peptídeos da invenção em um paciente e ou a comparação do nível detectado ao nível de controle normal ou a um nível de linha de base em um assunto previamente determinado (por exemplo, antes de qualquer doença). Os anticorpos podem ser usados como terapêutica para modular a atividade de um ou mais peptídeos da invenção, tendo assim um efeito de uma condição ou desordem.

[0196] A presente invenção proporciona kits, incluindo, mas não limitado a, sequências de peptídeos da invenção, opcionalmente em combinação com um ou mais agentes terapêuticos, as composições e as suas composições farmacêuticas embalados em material de embalagem adequado. Um kit inclui, opcionalmente, uma etiqueta ou inserção de embalagem que inclui uma descrição dos componentes ou instruções para o uso *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* dos seus componentes. Instruções exemplares incluem instruções para reduzir ou minimizar a glicose no sangue, o tratamento de hiperglicemia, o tratamento da diabetes, etc.

[0197] Um kit pode conter um conjunto de tais componentes, por exemplo, duas ou mais sequências de peptídeos sozinhas ou uma combinação de uma sequência de peptídeo com uma outra composição terapeuticamente útil (por exemplo, uma droga antidiabética, tal como um composto de gastrina).

[0198] O termo "material de embalagem" refere-se a uma caixa de estrutura física armazenando dos componentes do kit. O material de embalagem pode manter os componentes de forma

estéril e pode ser feito de material comumente usado para tais fins (por exemplo, papel, fibra de papelão ondulado, vidro, plástico, papel alumínio, ampolas, frascos, tubos, etc.).

[0199] Os kits da invenção podem incluir etiquetas ou inserções. Etiquetas ou inserções incluem "impressos", por exemplo, papel ou papelão, separado ou afixado num componente ou um kit ou material de embalagem (por exemplo, uma caixa), ou ligado a, por exemplo, uma ampola, tubo ou frasco contendo um componente do kit. Etiquetas ou inserções podem ainda incluir um meio legível por computador, como um disco (por exemplo, disco rígido, cartão, disco de memória), disco óptico, como CD- ou DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, fita magnética ou uma mídia de armazenamento elétrica, como memória RAM e ROM ou híbridos desses como meios magnéticos/ópticos de armazenamento, mídia flash ou tipo de memória cartões.

[0200] As etiquetas ou inserções podem incluir informações de identificação de um ou mais componentes, valores de dose, farmacologia clínica do(s) ingrediente(s) ativo(s) incluindo mecanismo de ação, farmacocinética e farmacodinâmica. Etiquetas ou inserções podem incluir informações de identificação informações do fabricante, número de lote, localização do fabricante e data.

[0201] As etiquetas ou inserções podem incluir informações sobre uma condição, desordem, doença ou sintoma para o qual pode ser utilizado um componente do kit. Etiquetas ou inserções podem incluir instruções para o clínico ou de um objeto para o uso de um ou mais dos componentes do kit em um método, protocolo de tratamento ou regime terapêutico. As instruções podem incluir quantidades de dosagem, frequência ou

duração e as instruções para a prática de qualquer um dos métodos, protocolos de tratamento ou regimes terapêuticos aqui estabelecidos. Instruções exemplares incluem instruções para o tratamento ou uso de uma sequência de peptídeo como aqui estabelecido. Os kits da invenção, portanto, pode incluir, adicionalmente, as etiquetas ou as instruções para a prática de qualquer dos métodos e usos da presente invenção aqui descrita, incluindo os métodos de tratamento e usos.

[0202] As etiquetas ou inserções podem incluir informações sobre qualquer benefício que um componente pode proporcionar, como um benefício profilático ou terapêutico. Etiquetas ou inserções podem incluir informações sobre os potenciais efeitos colaterais adversos, tais como avisos ao paciente ou situações médicas em que não seria apropriado usar uma composição particular. Efeitos colaterais adversos podem também ocorrer quando o paciente tem, vai ser ou está atualmente tomando um ou mais medicamentos que podem ser incompatíveis com a composição, ou o paciente tem, será ou está passando por outro protocolo de tratamento ou esquema terapêutico que seria incompatível com a composição e, por conseguinte, as instruções podem incluir informações relativas a tais incompatibilidades.

[0203] Kits da invenção podem incluir adicionalmente outros componentes. Cada componente do kit pode ser fechado dentro de um recipiente individual e todos os diversos recipientes podem estar dentro de um único pacote. Kits de invenção podem ser projetados para o armazenamento a frio. Kits da invenção podem ainda ser concebidos para conter sequências de peptídeos da invenção ou que contêm ácidos nucleicos que codificam

sequências de peptídeos. As células do kit podem ser mantidas sob condições de armazenamento adequadas até estarem prontas para uso.

[0204] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um vulgar perito na arte à qual este invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou testes da invenção, os métodos e materiais adequados são descritos aqui.

[0205] Todos os pedidos, publicações, patentes e outras referências, citações GenBank e citações ATCC aqui citadas são incorporadas por referência na sua totalidade. Em caso de conflito, a especificação, incluindo definições, irá controlar. Tal como aqui utilizado, as formas singulares "um, "e" e "o" incluem referentes plurais a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "uma sequência de peptídeos" ou "tratamento" inclui uma pluralidade de tais sequências, tratamentos, etc.

[0206] Tal como aqui utilizados, os valores numéricos são frequentemente apresentados num formato de faixa ao longo deste documento. O uso de um formato de faixa é apenas por conveniência e brevidade e não deve ser interpretado como uma limitação inflexível sobre o âmbito da invenção a menos que o contexto indique claramente o contrário. Consequentemente, o uso de uma faixa inclui expressamente todos os possíveis sub-intervalos, todos os valores numéricos individuais dentro desta faixa e todos os valores numéricos ou intervalos numéricos incluindo números inteiros dentro dessas faixas e

das frações de valores ou números inteiros dentro dos padrões, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Esta construção é aplicável independentemente da largura do intervalo e em todos os contextos ao longo deste documento de patente. Assim, por exemplo, a referência a uma faixa de 90 a 100%, inclui 91 a 99%, 92 a 98%, 93 a 95%, 91 a 98%, 91 a 97%, 91 a 96%, 91 a 95%, 91 a 94%, 91 a 93%, e assim por diante. A referência a um intervalo de 90 a 100%, também inclui 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, etc, assim como 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5%, etc, 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5%, etc, e assim por diante.

[0207] Além disso, a referência a uma faixa de 1 a 3, 3 a 5, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 110, 110 a 120, 120 a 130, 130 a 140, 140 a 150, 150 a 160, 160 a 170, 170 a 180, 180 a 190, 190 a 200, 200 a 225, 225 a 250 incluindo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. Em mais um exemplo, a referência a uma faixa de 25 a 250, 250 a 500, 500 a 1000, 1000 a 2500 ou 2500 a 5000, 5000 a 25,000, 5000 a 50,000 inclui qualquer valor numérico ou um intervalo dentro ou englobando tais valores, por exemplo, 25, 26, 27, 28, 29 ... 250, 251, 252, 253, 254....500, 501, 502, 503, 504..., etc.

[0208] Tal como aqui utilizado, também uma série de intervalos são descritos ao longo deste documento. O uso de uma série de faixas incluem combinações das faixas superior e inferior para proporcionar uma faixa mais ampla. Esta construção é aplicável independentemente da largura do intervalo e em todos os contextos ao longo deste documento de

patente. Assim, por exemplo, a referência a uma série de faixas, tais como 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 75, 75 a 100, 100 a 150, inclui faixas como 5 a 20, 5 a 30, 5 a 40, 5 a 50, 5 a 75, 5 a 100, 5 a 150 e 10 a 30, 10 a 40, 10 a 50, 10 a 75, 10 a 100, 10 a 150 e 20 a 40, 20 a 50, 20 a 75, 20 a 100, 20 a 150 e assim por diante.

[0209] Por razões de concisão, certas abreviaturas são aqui usadas. Um exemplo é a única letra de abreviatura para representar resíduos de aminoácidos. Os aminoácidos e suas abreviaturas correspondentes de três letras e uma única letra são como se segue:

alanina	Ala	(A)
arginina	Arg	(R)
asparagina	Asn	(N)
ácido aspártico	Asp	(D)
cisteína	Cys	(C)
ácido glutâmico	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)
proolina	Pro	(P)
serina	Ser	(S)

treonina	Thr	(T)
triptofano	Trp	(W)
tirosina	Tyr	(Y)
valina	Val	(V)

[0210] A invenção é geralmente revelada aqui utilizando linguagem afirmativa para descrever as várias formas de realização. A invenção também inclui especificamente formas de realização em que determinado assunto é excluído, no todo ou em parte, como substâncias ou materiais, as etapas do método e condições, protocolos, procedimentos, ensaios ou análises. Assim, embora a invenção geral não seja aqui expressa em termos do que a invenção não inclui, aspectos que não estão expressamente incluídos na presente invenção são, no entanto, aqui divulgados.

[0211] Foram descritos uma série de formas de realização da invenção. No entanto, será entendido que várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e âmbito da invenção. Por conseguinte, os exemplos seguintes destinam-se a ilustrar, mas não limitar o âmbito da invenção descrita nas reivindicações.

Exemplos

Exemplo 1

[0212] O que se segue é uma descrição de vários métodos e materiais utilizados nos estudos aqui descritos.

[0213] **Animais.** Ratos *db/db* foram adquiridos no *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME). Os ratos foram mantidos de acordo com as diretrizes de bem-estar sob luz controlada (12 horas de luz e 12 horas de ciclo escuro, escuro 06:30 pm a 6:30 am),

condições de temperatura ($22\pm4^{\circ}\text{C}$) e umidade ($50\%\pm20\%$). Eles tinham livre acesso à água (água destilada autoclavada) e foram alimentados *ad libitum* com uma dieta comercial (*Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, Irradiated 2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet*), contendo 17 kcal%de gordura, 23 kcal%de proteína e 60 kcal%de carboidratos. Para obesidade induzida por dieta, os ratos C57BL6/J (*Jackson Laboratory*) foram mantidos em uma dieta rica em gordura (D12492, *Research Diet, New Brunswick, NJ. USA*), contendo 60 kcal%de gordura, 20 kcal%de proteína e 20 kcal%de carboidratos durante 16 a 20 semanas. Todos os estudos com animais foram aprovados pelo NGM Institutional Animal Care and Use Committee.

[0214] **Sequências de DNA e de aminoácidos.** cDNA de ORF codificando variantes FGF19 humano (*Homo sapiens* FGF19, GenBank Accession No. NM_005117.2).

[0215] Sequência de proteínas codificadas pelo cDNA (GenBank Accession No. NP_005108.1) **PCR.** FGF19 ORF foi amplificado com reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando DNA recombinante (cDNA) preparado a partir de tecido do intestino delgado humano. Kits reagentes PCR com Phusion de alta fidelidade da polimerase de DNA foram adquiridos de New England BioLabs (F-530L, Ipswich, MA). Foram utilizados os seguintes iniciadores: iniciador de PCR para a frente: 5' CCGACTAGTCACCAatgcggagcggtgtgg e iniciador de PCR inverso: 5' ATAAGAATGCGGCCGCTTACTTCTCAAAGCTGGACTCCTC.

[0216] Fragmento de DNA amplificado foi digerido com as enzimas de restrição Spe I e Not I (os locais de restrição foram incluídos nos iniciadores de PCR 5' e 3', respectivamente) e foi em seguida ligado com vetores transgene

AAV que tinham sido digeridos com a mesma restrição enzimas. O vetor utilizado para a expressão continha um marcador selecionável e uma cassette de expressão constituída por um promotor eucariota forte 5' de um local para a inserção da sequência de codificação clonada, seguida por uma região 3' não traduzida e de poliadenilação do hormônio de crescimento da cauda bovino. A construção de expressão também é flanqueada por repetições terminais internas na extremidade 5' e 3'.

[0217] **Produção e purificação de AAV.** Células AAV293 (obtidas a partir da Agilent Technologies, Santa Clara, CA) foram cultivadas em Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM, Mediatech, Inc. Manassas, VA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e solução de antibiótico-antimicótico 1x (Mediatech, Inc. Manassas, VA). As células foram plaqueadas a uma densidade de 50% no dia 1 em placas de cultura de células de 150 milímetros e transfectadas no dia 2, utilizando o método de precipitação com fosfato de cálcio com os três plasmídeos que se seguem (20 µg/ cada placa): plasmídeo de AAV transgene, plasmídeos pHelper (Agilent Technologies) e plasmídeo AAV2/9 (Gao et al., *J. Virol.* 78:6381 (2004)). 48 horas após a transfecção, as células foram raspadas das placas, sedimentadas por centrifugação a 3000xg e ressuspensas em tampão contendo 20 mM Tris pH 8,5, NaCl 100 mM e MgCl₂ 1 mM. A suspensão foi congelada num banho de gelo seco e álcool foi então descongelada em banho de água a 37°C. Os ciclos de congelamento e descongelamento foram repetidos três vezes; Benzenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionado a 50 unidades/ml; desoxicolato foi adicionado a uma concentração final de 0,25%. Após uma incubação a 37°C durante

30 minutos, os detritos celulares foram sedimentados por centrifugação a 5000xg durante 20 min. As partículas virais presentes no sobrenadante foram purificadas utilizando um gradiente descontinuado iodixanal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como anteriormente descrito (Zolotukhin S. et al (1999) Gene Ther. 6:973). O estoque viral foi concentrado utilizando Vivaspin 20 (MW cutoff 100.000 Dalton, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, França) e ressuspenso em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 10% de glicerol e armazenado a -80°C. Para determinar o número de cópia do genoma viral, 2 µl de estoque viral foram incubadas em 6 µl de solução contendo 50 unidades/ml de Benzonase, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, MgCl₂ 10 mM e CaCl₂ 10 mM a 37°C durante 30 minutos.

[0218] Em seguida, 15 µl de solução contendo 2 mg/ml de proteinase K, SDS a 0,5% e EDTA 25 mM foram adicionados e a mistura foi incubada durante mais 20 min a 55°C para libertar o DNA viral. O DNA viral foi limpo com mini-kit DNeasy (Qiagen, Valencia, CA) e eluído com 40 µl de água. Cópia do genoma viral (GC) foi determinada utilizando PCR quantitativo.

[0219] Estoque viral foi diluído com PBS para desejável GC/ml. Solução de trabalho viral (200 µl) foi entregue em ratos através de injeção na veia da cauda.

[0220] **Ensaio de glicose no sangue.** Glicemia em recorte da cauda de rato foi medida utilizando tiras de teste ACCU-CHEK Active lidos por ACCU-CHEK Active medidor (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) seguindo as instruções do fabricante.

[0221] **Ensaio perfil lipídico.** O sangue total a partir de recortes da cauda de rato foi coletado em tubos capilares lisos (BD Clay Adams SurePrep, Becton Dickenson e Co. Sparks,

MD). O soro e as células do sangue foram separados por centrifugação dos tubos em um Autocrit Ultra 3 (Becton Dickinson and Co. Sparks, MD). As amostras de soro foram testadas para o perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total, HDL e não-HDL), utilizando Integra 400 Clinical Analyzer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) seguindo as instruções do fabricante.

[0222] Ensaio de nível de exposição do soro

FGF19/FGF21/variantes. O sangue total (cerca de 50 µl/mouse) a partir de recortes da cauda do rato foi coletado em tubos capilares lisos (BD Clay Adams SurePrep, Becton Dickenson e Co. Sparks, MD). O soro e as células do sangue foram separados por centrifugação dos tubos em um Autocrit Ultra 3 (Becton Dickinson and Co. Sparks, MD). Níveis de exposição de FGF19, FGF21 e variante no soro foram determinados utilizando kits de EIA (Biovendor), seguindo as instruções do fabricante.

[0223] Ensaio de carcinoma hepatocelular (HCC). Espécime de fígado foi colhido a partir de ratos *db/db* 6 meses após a injeção de AAV. Pontuação de HCC é registada como o número de nódulos de HCC na superfície de todo o fígado de ratos injetados com variantes dividido pelo número de nódulos de HCC de ratos injetados com FGF19 de tipo selvagem.

[0224] Ensaio expressão gênica hepática. Espécime de fígado foi colhido e homogeneizado em reagente Trizol (Invitrogen). O RNA total foi extraído seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi tratado com DNase (Ambion), seguido por análise quantitativa de RT-PCR utilizando iniciadores Taqman e reagentes de *Applied Biosystems*. Os níveis de ARNm relativos

da aldo-ceto redutase e slc1a2 no fígado foi calculado utilizando o método de $\Delta\Delta Ct$.

[0225] Ensaios de atividade e ligação FGFR4. ELISA em fase sólida (ligação) e ensaio de fosforilação de ERK foram realizados utilizando proteínas recombinantes purificadas. Ensaio de ligação de FGFR foi realizado utilizando ELISA fase sólida. Resumidamente, placa de 96 poços foi revestida com 2 ug/ml anticorpo anti-hFc e incubada com 1 ug/ml de FGFR1-hFc ou FGFR4-hFc. A ligação às variantes FGF19 na presença de 1 ug/ml de b-klotho solúvel e 20 ug/ml de heparina foi detectada por anticorpos biotinilados anti-FGF19 (0.2ug/mL), seguido por incubação com estreptavidina-HRP (100ng/ml). Para o ensaio de ativação FGFR4, células Hep3B foram estimuladas com variantes FGF19 durante 10 minutos a 37°C, em seguida, imediatamente lisadas e ensaiadas para a fosforilação de ERK, utilizando um kit disponível comercialmente a partir de Cis-Bio.

Exemplo 2

[0226] O que se segue é uma descrição de estudos que mostram a atividade de redução de glicose de várias variantes de sequências de FGF19 e FGF21 e construções de fusão FGF19/FGF21.

[0227] A Figura 2 ilustra estruturas de fusão FGF19/FGF21 exemplificativas e os segmentos de cada um dos FGF19 e FGF21 presentes nos peptídeos fundidos. Estes peptídeos foram analisados para atividade de redução da glicose e, estatisticamente, significativa elevação ou um aumento da atividade de lipídeo (Tabelas 1 a 8 e Figura 1).

[0228] Ratos (db/db) foram injetados com vetor viral expressando FGF19, FGF21 ou variantes, e analisados após a

injeção. Atividade de redução de glicose de cada sequência é representada por um símbolo "+" (um símbolo "—" significa nenhuma atividade de redução da glicemia, um símbolo "+/—" significa que variantes mantém atividade mínima de redução da glicose); atividade de elevação de lipídeo é representada por um sinal "+" (um símbolo "—" significa que não há atividade de elevação de lipídeo, um símbolo "+/—" significa que variantes mantém a atividade mínima de elevação do lipídeo, Figura 2).

[0229] Duas fusões de FGF21 e FGF19, denotadas variante M5 (SEQ ID NO: 5) e variante 45 (M45 (SEQ ID NO: 45)), exibiram atividade de redução de glicose e uma ausência estatisticamente significativa de elevação de lipídios ou aumento da atividade. Variantes denotadas M1 (SEQ ID NO: 1), M2 (SEQ ID NO: 2) e M69 (SEQ ID NO: 69), respectivamente (Figura 1), também exibiu atividade de redução de glicose (Figura 3B e 3C, Tabela 5). Dados comparando atividade de redução de glicose e elevação de lipídios ou aumento da atividade de M5 (SEQ ID NO: 5), M1 (SEQ ID NO: 1), M2 (SEQ ID NO: 2) e M69 (SEQ ID NO: 69) com FGF19 e FGF21 estão ilustrados nas Figuras 3A a 3C e 4A a 4C.

Exemplo 3

[0230] O que se segue é uma descrição de estudos que mostram que as variantes M5 (SEQ ID NO: 5), M1 (SEQ ID NO: 1), M2 (SEQ ID NO: 2) e M69 (SEQ ID NO: 69) não são tumorgênicas, conforme determinado pela formação de carcinoma hepatocelular (HCC) e que as variantes que M5 (SEQ ID NO: 5), M2 (SEQ ID NO: 2) e M69 (SEQ ID NO: 69) também não reduzem a massa muscular magra e massa gorda.

[0231] Animais (*db/db*) foram injetados com vetores AAV expressando FGF19, FGF21, M5 (SEQ ID NO: 5), M1 (SEQ ID NO: 1), M2 (SEQ ID NO: 2), ou M69 (SEQ ID NO: 69) ou injetados com solução salina e analisados 6 meses após a injeção. Os dados indicam que as variantes M5 (SEQ ID NO: 5), M1 (SEQ ID NO: 1), M2 (SEQ ID NO: 2), e M69 (SEQ ID NO: 69) não induziram a formação (HCC) significativa (Figuras 5A a 5C).

[0232] Animais (ratos *db/db*) também foram injetados com vetor viral expressando FGF19, FGF21, M5 (SEQ ID NO: 5), M1 (SEQ ID NO: 1), M2 (SEQ ID NO: 2) ou M69 (SEQ ID NO: 69) ou injetados com solução salina e analisados seis meses após a injeção para o efeito sobre a massa magra e massa gorda. Os dados indicam que peptídeos M5 (SEQ ID NO: 5), M2 (SEQ ID NO: 2) e M69 (SEQ ID NO: 69) não provocaram uma redução estatisticamente significativa da massa magra ou massa gorda, em contraste com o FGF21, e que peptídeo M1 (SEQ ID NO: 1) reduz a massa magra (Figuras 6A a 6C).

Exemplo 4

[0233] A seguir, um resumo dos dados de 25 peptídeos variantes adicionais analisados para a atividade de elevação de lipídios e tumorigênese. Os dados mostram claramente uma correlação positiva entre a elevação de lipídeos e a tumorigênese, conforme determinado pela formação carcinoma hepatocelular (HCC) em ratos *db/db*.

[0234] Tabelas 1 a 3 resumem dados para 26 peptídeos variantes diferentes. Tais peptídeos variantes exemplificados têm sequência C-terminal FGF19: PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTG

LEAVRSPSFEK na porção C-terminal, por exemplo, seguindo os resíduos de aminoácidos "ETG". Notavelmente, peptídeos variantes (total de 7, incluindo M5 (SEQ ID NO: 5)) que não causam um aumento estatisticamente significativo de lipídios não induziram formação carcinoma hepatocelular (HCC). Em contraste, todos os peptídeos variantes (17 no total) que causaram um aumento estatisticamente significativo de lipídios também causou formação de carcinoma hepatocelular (HCC) em ratos. Estes dados indicam que existe uma forte correlação positiva entre a atividade de elevação de lipídios e formação de carcinoma hepatocelular (HCC). Por conseguinte, a atividade de elevação de lipídeo pode ser usada como um indicador e/ou prognóstico de formação de carcinoma hepatocelular (HCC) em animais.

Tabela 1: Triglicerídeos e colesterol elevados em ratos db/db parece correlacionar-se positivamente com a formação de HCC.

	Domínio N-terminal	Principal Elevação Lipídeos	Formação HCC	
			+	-
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
M5	R-HPIPDSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
M74	RDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M75	RVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M76	RGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M77	R	RLRHLYTSG	-	-
M78	RAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M79	RGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M80	RPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M81	RHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-

Tabela 2: Triglicerídeo e colesterol elevado em ratos db/db parece se correlacionar positivamente com formação de HCC

	Domínio N-terminal	Principal	Elevação lipídeos	Formação de HCC
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSPLQ--FGGQV	RQRHLYTDD	-	-
M82	RPLAFSAAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+	+
M83	RPLAFSDAAPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+/-	+/-
M84	RPLAFSDAGAHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+/-	+/-
M85	RPLAFSDAGPHVHYGAGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M86	RPLAFSDAGPHVHYGWGAPI	RLRHLYTSG	+	+
M87	RPLAFSDAGPHVHYGWDAI	RLRHLYTSG	+	+

Tabela 3: Triglicerídeo e colesterol elevado em ratos db/db parece se correlacionar positivamente com formação de HCC

	Domínio N-terminal	Principal	Elevação <u>lipídeos</u>	Formação de HCC
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
H31A/S141A (M88)		FGF19	+	+
H31A/H142A (M89)		FGF19	+	+
K127A/R129A (M90)		FGF19	+	+
K127A/S141A (M91)		FGF19	+	+
K127A/H142A (M92)		FGF19	+	+
R129A/S141A (M93)		FGF19	+	+
S141A/H142A (M94)		FGF19	+	+
K127A/H142A (M95)		FGF19	+	+
K127A/R129A/S141A (M97)		FGF19	+	+
K127A/R129A/H142A (M98)		FGF19	+	+
K127A/R129A/S141A/H142A (M99)	FGF19	+	+	+

Exemplo 5

[0236] A seguir, um resumo dos dados de peptídeos variantes FGF19 adicionais analisados para a atividade de redução de glicose e atividade de elevação de lipídios.

[0237] A Tabela 4 ilustra as “sequências principais” de peptídeo de 35 variantes FGF19 adicionais, denotadas M5 (SEQ ID NO: 5) a M40 (SEQ ID NO: 40). Tais peptídeos variantes exemplificados têm sequência FGF19 C-terminal, PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYL CMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPL

SHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK na porção C-terminal, por exemplo, seguindo os resíduos de aminoácidos "ETG" da sequência principal. Os dados mostram claramente que as variantes M6 (SEQ ID NO: 6), M7 (SEQ ID NO: 7), M8 (SEQ ID NO: 8), mM38 e M39 (SEQ ID NO: 39) têm as características desejadas de atividade de redução de glicose e não estatisticamente significativa atividade de elevação de lipídeos em ratos *db/db*.

Tabela 4: Variantes adicionais e Mapeamento do domínio N-terminal

Domínio N-terminal	Principal	Redução		Elevação	
		de		de	
		Glicose	lipídeos	Glicose	lipídeos
FGF19 RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+		+	
FGF21 HPIPDSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	+		-	
M5 R-HPIPDSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+		-	
M6 R-----DSSPLLQ-- FGGQV	RLRHLYTSG	+		-	
M7 RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+		-	
M8 R-HPIPDSPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	+		-	
M9 R-HPIPDSPLLQFGWGDPPI	RLRHLYTSG	+		+	
M10 R-HPIPDSSPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-		+	
M11 RPLAFSDAGPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	
M12 RPLAFSDAGPLLQFGWGDPPI	RLRHLYTSG	-		+	
M13 RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-		-	
M14 R-HPIPDSSPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	-		-	
M15 RPLAFSDAGPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	+		+	
M16 RPLAFSDAGPHVH--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D		N/D	

M17	RPLAFSDAGPHV--GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M18	RPLAFSDAGPH--YGWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M19	RPLAFSDAGP-V-YGWDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M20	RPLAFSDAGP-VH-GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M21	RPLAFSDAGP-VHY-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M22	RPLAFSDAGPHVH-GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M23	RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M24	RPLAFSDAGPH-HY-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M25	RPLAFSDAGPHV-Y-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M26	RPLAFSDSSPLVH--WGDPPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M27	RPLAFSDSSPHVH--WGDPPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M28	RPLAFSDAPHV---WGDPPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M29	RPLAFSDAGPHVHY-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M30	RPLAFSDAGPHVHYAWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
M31	R-HPIPDSPLLQ--FGAQV	RLRHLYTSG	+/-	-
M32	R-HPIPDSPLLQ--FGIYQV	RLRHLYTSG	-	-
M33	R-HPIPDSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
M34	R-HPIPDSPLLQ--FG7AV	RLRHLYTSG	+/-	-
M35	R-HPIPDSPLLQ--FGGEV	RLRHLYTSG	+/-	+/
M36	R-HPIPDSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+/-	-
M37	R-HPIPDSPLLQ--FGGUUA	RLRHLYTSG	-	-
M38	R-HPIPDSPLLQ--FGGQT	RLRHLYTSG	+	-
M39	R-HPIPDSPLLQ--FGGQT	RLRHLYTSG	+	-
M40	R-HPIPDSPLLQFGWGQPO	RLRHLYTSG	-	+

Tabela 4a:

	Domínio N-terminal	Principal	Redução de Glicose	Elevação de Lipídeos	Formação de HCC
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI RLRHLYTSG		+	+	+
FGF21	HPIPDSPLLQ--FGGQV QRQYLYTDD		+	-	-
M5	R-HPIPDSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		+	-	-
M9	R-HPIPDSPLLQFGWGDPI RLRHLYTSG		+	+	+
M8	R-HPIPDSPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG		+	+	+
M12	RPLAFSDAGPLLQFGWGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
M10	R-HIPDSSPHVHYGWGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
M13	RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		-	+	+
M15	RPLAFSDAGPHVHYG--GQV RLRHLYTSG		-	-	+/-
M14	R-HIPDSSPHVHYG--GQV RLRHLYTSG		-	-	+/-
M43	RPLAFSDAGPHVHYG-GD-I RLRHLYTSG		-	-	+/-
M6	R-----DSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		+	-	-
M7	RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		+	-	-

Tabela 4b:

	Domínio N-terminal	Principal	Redução de Glicose	Elevação de Lipídeos	Formação de HCC
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI RLRHLYTSG		+	+	+
FGF21	HPIPDSPLLQ--FGGQV QRQYLYTDD		+	-	-
M5	R-HPIPDSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		+	-	-
M31	R-HPIPDSPLLQ--FGAQV RLRHLYTSG		+	-	+
M32	R-HPIPDSPLLQ--FGDQV RLRHLYTSG		+	-	-
M33	R-HPIPDSPLLQ--FGPQV RLRHLYTSG		-	-	+
M34	R-HPIPDSPLLQ--FGGAV RLRHLYTSG		-	-	+
M35	R-HPIPDSPLLQ--FGGEV RLRHLYTSG		-	-	+
M36	R-HPIPDSPLLQ--FGGNV RLRHLYTSG		+	-	+/-
M37	R-HPIPDSPLLQ--FGGQA RLRHLYTSG		-	-	+
M38	R-HPIPDSPLLQ--FGGQI RLRHLYTSG		-	-	+
M39	R-HPIPDSPLLQ--FGGQT RLRHLYTSG		-	-	+
M40	R-HPIPDSPLLQFGWQPV RLRHLYTSG		-	+	+

Tabela 4c:

	Domínio N-terminal	Principal	Redução de Glicose	Elevação de Lipídeos	Formação de HCC
FGF19		RPLAFSDAGPHVHYGWGDP I RLRHLYTSG	+	+	+
FGF21		HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRHLYTDD	+	-	-
M5		R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-
M52		R----DSSPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	-
M54		RPLAFSDAGPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M55		RPLAFSDAGPH--YGWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M56		RPLAFSDAGP-V-YGWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M57		RPLAFSDAGP-VH-GWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M58		RPLAFSDAGP-VHY-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M59		RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M60		RPLAFSDAGPH-HY-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M61		RPLAFSDAGPHV--GWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M62		RPLAFSDAGPHV-Y-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M63		RPLAFSDAGPHVH--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M64		RPLAFSDSSPLVH--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M65		RPLAFSDSSPHVH--WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M66		RPLAFSDAGPHLQ--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M67		RPLAFSDAGPHV---WGDPI RLRHLYTSG	-	-	+/-
M68		RPLAFSDAGPHVHY-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	-
M4		RPLAFSDAGPHVHYAWGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M69		R----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	-
M70		MR----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	-
M53		M----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	-

[0238] A Tabela 5 ilustra as sequências de peptídeos de 3 variantes FGF19 adicionais, denotadas M1 (SEQ ID NO: 1), M2 (SEQ ID NO: 2) e M69 (SEQ ID NO: 69). Os dados mostram claramente que estas três variantes possuem as características desejadas de atividade de redução da glicemia em ratos db/db (Figuras 3B e 3C). Estas três variantes parecem elevar lipídeos em ratos db/db (Figuras 4B e 4C).

Tabela 5: Variantes adicionais

M1	(SEQ	ID	NO :
1) :RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL IKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHLRPLV SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTG LEAVRSPSFEK			
M2	(SEQ	ID	NO :
2) :RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL IKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHLRPLV SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTG LEAVRSPSFEK			
M69	(SEQ	ID	NO :
69) :RDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAV ALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHLRPLVSLSS AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAV RSPSFEK			

Exemplo 6

[0239] A seguir, um resumo de dados mostrando que FGF19 reduz o peso corporal em ratos obesos induzidos por dieta e em ratos ob/ob e atividade de formação de tumores de fígado e peso corporal em ratos db/db.

[0240] Os ratos foram injetados com FGF19 ou FGF21 em vetor AAV. O peso corporal foi registado 4 semanas após a injeção.

Tabela 6: FGF19 reduz o peso corporal em ratos obesos induzidos por dieta e em ratos ob/ob

	Domínio N-terminal	Redução do Peso Corporal em DIO	Redução do Peso Corporal em Ob/ob
	Principal		
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSPLLQ--FGGQV RQRQLYTDD	+	+

Tabela 7: Correlação entre peso corporal e formação de tumor no fígado de FGF19, FGF21 e variantes selecionadas em ratos db/db

	Domínio N-terminal	Principal	Nódulo Tumoral no Fígado	Peso Corporal
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG		+	Aumentou
FGF21	HPIPDSPLLQ--FGGQV RQRQLYTDD		-	Diminuiu
M5	R-HPIPDSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		-	Aumentou
M6	R----DSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		-	Diminuiu
M32	R-HPIPDSPLLQ--FGDQV RLRHLYTSG		-	Diminuiu
M52	R----DSSPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG		-	Diminuiu
M69	R----DSSPLVHYGWDPI RLRHLYTSG		-	Aumentou

Exemplo 7

[0241] O que se segue é um estudo mostrando que peptídeos variante M5 (SEQ ID NO: 5) e variante M69 (SEQ ID NO: 69) reduzem a glicose no sangue.

[0242] Ratos (ob/ob) foram injetados (por via subcutânea) com M5 (SEQ ID NO: 5) (0,1 e 1 mg/kg, s.c.) ou FGF19 (1 mg/kg, s.c.) ou variante M69 (SEQ ID NO: 69) (0,1 e 1 mg/kg, s.c.) ou FGF19 (1 mg/kg, s.c.). Os níveis de glicose no plasma foram medidos a 2, 4, 7 e 24 horas após a injeção e os resultados são mostrados na Figura 7. M5 (SEQ ID NO: 5) (Figura 7A) e variante M69 (SEQ ID NO: 69) (Figura 7B) mostraram efeitos de redução de glicose similares como tipo selvagem FGF19.

Exemplo 8

[0243] Este exemplo descreve um estudo mostrando que a expressão hepática de família 1 aldo-ceto redutase, membro C18 (AkrlC18) e família 1 carreadora de soluto, membro 2 (slc1a2) parece correlacionar-se com a atividade HCC.

[0244] Ratos (*db/db*) foram injetados com vetor viral que expressam FGF19 (HCC +), FGF21 (HCC-), dN2 (HCC-) ou M5 (SEQ ID NO: 5) (HCC-) ou injetados com GFP. Amostras de fígado foram colhidas e analisadas por RT-PCR 2 quantitativa semanas após a injeção. Os dados, apresentados na Figura 8, mostram que a expressão hepática do AkrlC18 e slc1a2 parece correlacionar-se com a atividade de HCC.

Tabela 8:Resumo de variantes de FGF19 em Ensaio de sinalização de adipócito 3T3L1

P-Erk Ensaio em adipócitos 3T3L1	FGF19	FGF21	M5 (SEQ ID NO: 5)	M2 (SEQ ID NO: 2)	M63 (SEQ ID NO: 63)	M64 (SEQ ID NO: 64)	M1 (SEQ ID NO: 1)	M8 (SEQ ID NO: 8)
Experimento#1:								
Emax	3,67	4,33	3,52	4,19	3,21	3,67	4,24	4,16
EC50 (nM)	0,05	0,65	0,03	0,05	0,92	0,02	0,03	0,03
Experimento#2:								
Emax	4,52	4,83	4,01	5,56	4,17	4,85	5,30	5,34
EC50 (nM)	0,33	1,48	0,14	0,15	0,66	0,12	0,09	0,09
Experimento#3:								
Emax	4,09	4,14	3,74	4,24	3,15	4,15	4,77	4,16
EC50 (nM)	0,16	1,50	0,24	0,14	0,28	0,14	0,07	0,14

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo quimérico **caracterizado** pelo fato de que tem uma sequência de aminoácidos consistindo na SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 ou SEQ ID NO: 70.
2. Peptídeo quimérico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido peptídeo tem uma sequência de aminoácidos consistindo na SEQ ID NO: 2.
3. Peptídeo quimérico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido peptídeo tem uma sequência de aminoácidos consistindo na SEQ ID NO: 52.
4. Peptídeo quimérico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido peptídeo tem uma sequência de aminoácidos consistindo na SEQ ID NO: 53.
5. Peptídeo quimérico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido peptídeo tem uma sequência de aminoácidos consistindo na SEQ ID NO: 70.
6. Peptídeo quimérico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido peptídeo tem uma sequência de aminoácidos consistindo na SEQ ID NO: 69.
7. Peptídeo quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o referido peptídeo é fundido com uma região Fc de imunoglobulina.
8. Composição farmacêutica **caracterizada** por compreender o peptídeo quimérico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e um veículo farmaceuticamente aceitável,

em que a composição farmacêutica opcionalmente compreende um agente hipoglicemiante.

9. Célula transformada **caracterizada** pelo fato de que expressa o peptídeo quimérico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a referida célula transformada é uma célula bacteriana ou de leveduras.

10. Uso do peptídeo quimérico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 **caracterizado** por ser na fabricação de um medicamento para tratar um indivíduo possuindo, ou em risco de ter, uma doença ou uma desordem tratável pelo peptídeo quimérico ou uma sequência peptídica;

em que opcionalmente

(a) a doença ou desordem compreende uma condição hiperglicêmica, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose ou síndrome metabólica;

em que opcionalmente a condição hiperglicêmica compreende

(i) diabetes;

em que opcionalmente o uso resulta em níveis reduzidos de glicose, sensibilidade à insulina aumentada, resistência à insulina reduzida, glucagon reduzida, melhoria na tolerância à glicose ou metabolismo da glicose ou homeostase, função do pâncreas melhorada, níveis de triglicerídeo, colesterol, IDL, LDL ou VLDL reduzidos, diminuição da pressão sanguínea, diminuição do espessamento da camada íntima do vaso sanguíneo ou uma diminuição da massa corporal ou ganho de peso; ou

(ii) diabetes insulino-dependente (tipo I), diabetes tipo II ou diabetes gestacional; ou

(b) a desordem compreende a obesidade ou uma massa corporal indesejável.

11. Uso do peptídeo quimérico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 **caracterizado** por ser na fabricação de um medicamento para aumentar o metabolismo da glicose ou homeostase em um indivíduo com necessidade do mesmo;

em que opcionalmente o indivíduo tem um nível de glicose no plasma em jejum superiores a 100 mg/dl ou tem um nível de hemoglobina A1c (HbA1c) acima de 6%; ou

em que opcionalmente o uso resulta em níveis reduzidos de glicose, sensibilidade à insulina aumentada, resistência à insulina reduzida, glucagon reduzida, melhoria na tolerância à glicose ou metabolismo da glicose ou homeostase, função do pâncreas melhorada, níveis de triglicerídeo, colesterol, IDL, LDL e VLDL reduzidos, diminuição da pressão sanguínea, diminuição do espessamento da camada íntima do vaso sanguíneo ou uma diminuição da massa corporal ou ganho de peso.

12. Peptídeo quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que é para melhorar o metabolismo da glicose em um indivíduo com necessidade do mesmo, em que o peptídeo quimérico é administrado ao sujeito em uma quantidade eficaz para melhorar o metabolismo da glicose.

13. Peptídeo quimérico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que é para o

tratamento de uma desordem tratável pelo peptídeo em um indivíduo com necessidade do mesmo, em que o peptídeo quimérico é administrado ao sujeito em uma quantidade eficaz para tratar a desordem.

FGF19

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL
 KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKH
 RLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
 FGLVTGLEAVRSPSFEK

FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQALK
 PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGPLHLP
 GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGP SQGRSPSYA
 S

M5

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQALK
 LRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPV
 LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLV
 TGLEAVRSPSFEK

M71

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQALK
 PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGPLHLP
 GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGP SQGRSPSYA
 S

M72

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQALK
 PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGPLHLP
 GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGP SQGRSPSYA
 S

M73

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEAHLEIREDTVGGAADQSPESLLQALK
 PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGPLHLP
 GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGP SQGRSPSYA
 EGCHMHPENCKTLTDIDRTHTEKPVWDGITGE

M1

RPLAFSDAS PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL
 KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKH
 RLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
 FGLVTGLEAVRSPSFEK

FIG. 1

M2

RPLAFSDSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
 KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVRSEKH
 RLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDMDP
 FGLVTGLEAVRSPSFEK

M69

RDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA
 LRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVRSEKHRLPV
 LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDMDPFGLVT
 GLEAVRSPSFEK

M3

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
 KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEILEDGYNVYRSEKHR
 LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDMDPF
 GLVTGLEAVRSPSFEK

M48

RDSSPLLQFGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRT
 VAIKGHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSS
 AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDMDPFGLVTGL
 EAVERSPSFEK

M49

RPLAFSDSSPLLQFGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA
 VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVRSEKHRLP
 VSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDMDPFGL
 VTGLEAVRSPSFEK

M50

RHIPDSSPLLQFGDQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
 ALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEILEDGYNVYRSEKHRLPV
 SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDMDPFGLV
 TGLEAVRSPSFEK

FIG. 1 (CONTINUAÇÃO)

M51

RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAV
ALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKRLPV
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLV
TGLEAVRSPSFEK

M52

RDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKRLPVSLSS
AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGL
EAVRSPSFEK

M53

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAVALRT
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKRLPVSLSS
AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLVTGL
EAVRSPSFEK

M70

MRDSSPLVHYWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEIKAV
ALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKRLPV
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDMPFGLV
TGLEAVRSPSFEK

FIG. 1 (CONTINUAÇÃO)

<u>FGF21</u>	<u>FGF21</u>	<u>Diminuição de Glicose</u>	<u>Aumento de Lipídeos</u>
<u>FGF19</u>			
1-181		-	-
-		+	+
1-16	FGF19	+	-
147-181	M5	+	-
1-16 & 147-181	M41	+/-	+
17-181	M42	-	-
1-146	M44	+	+
17-146	M45	-	-
	M46	+/-	-

FIG. 2

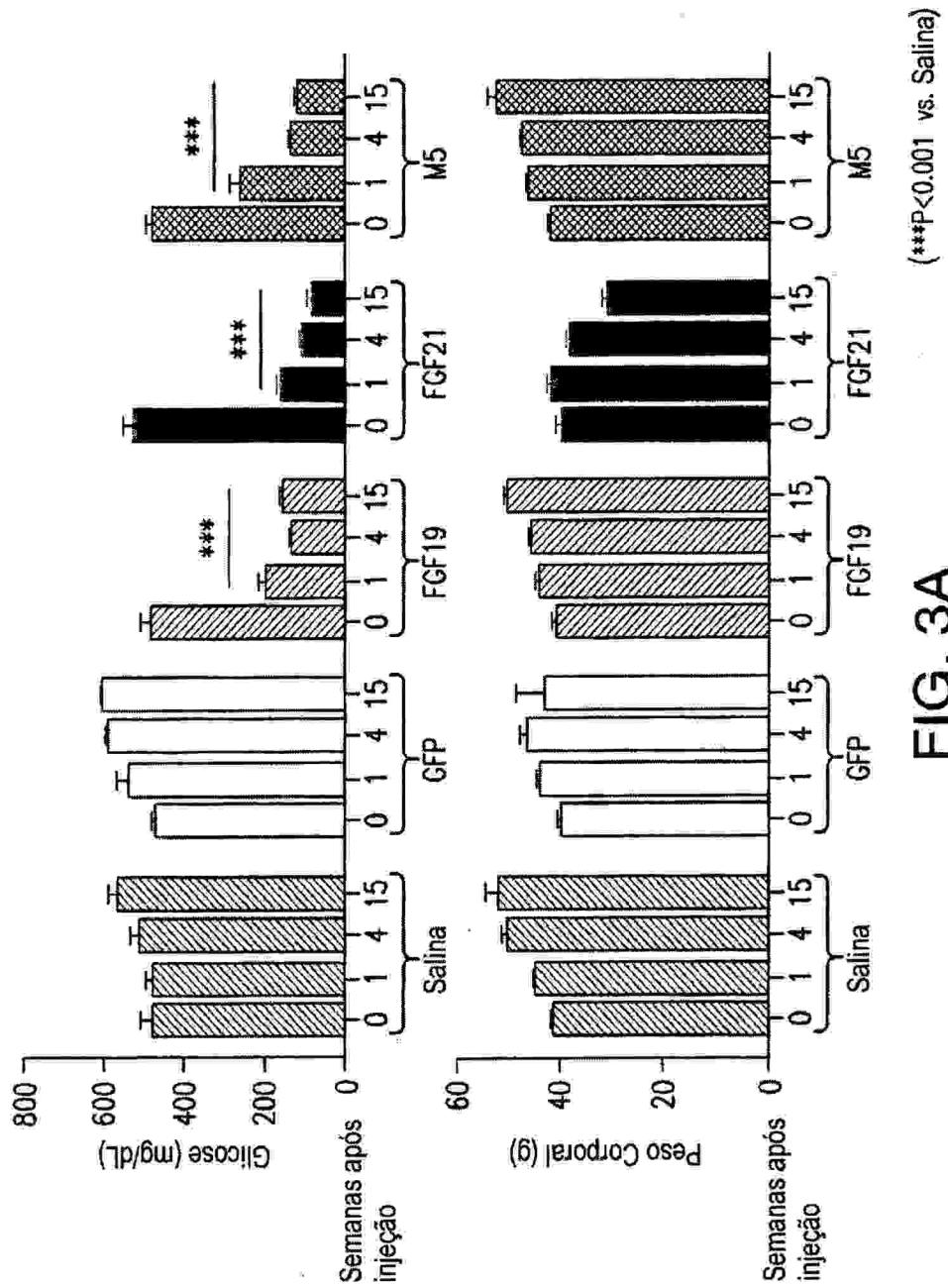


FIG. 3A

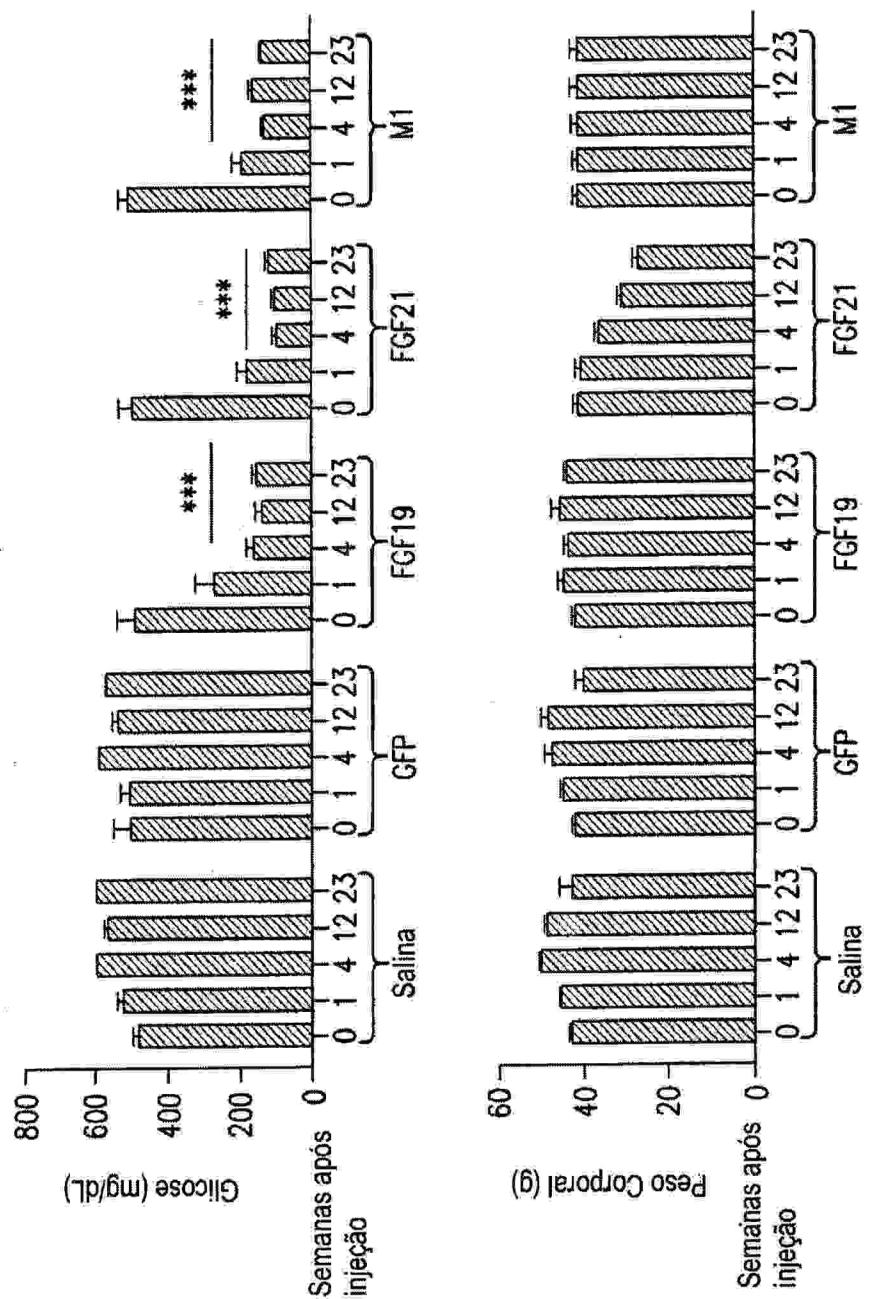


FIG. 3B

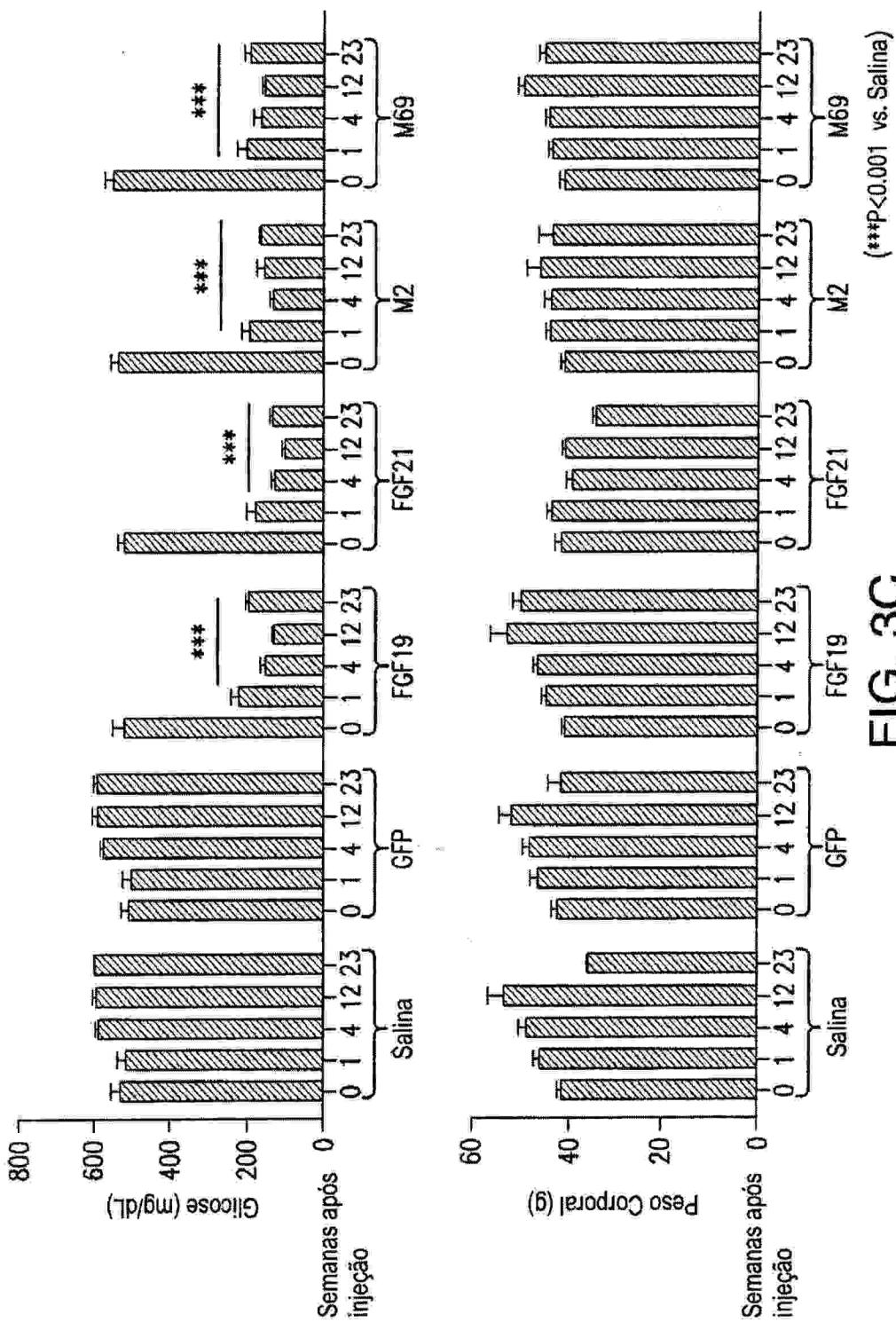
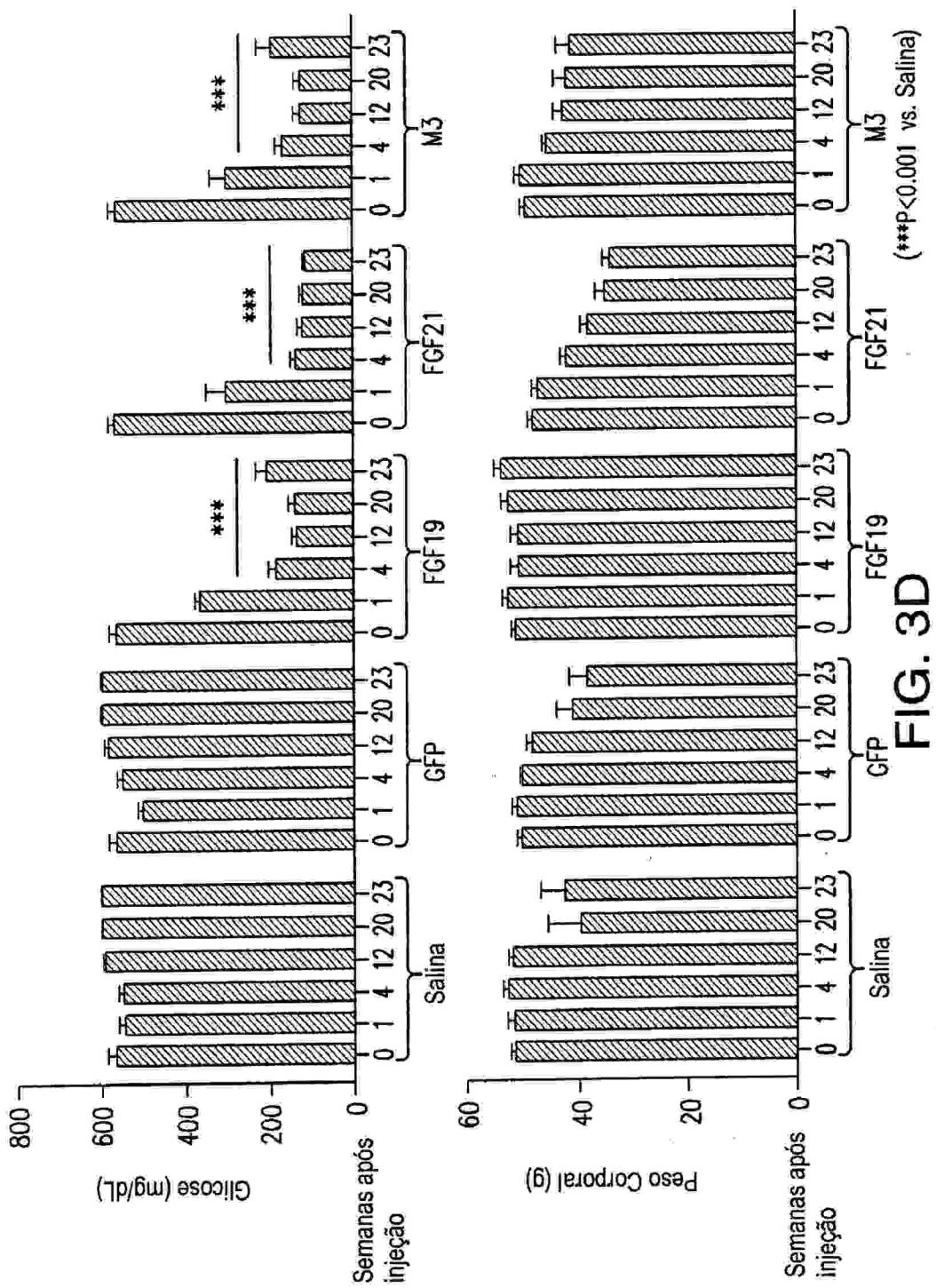
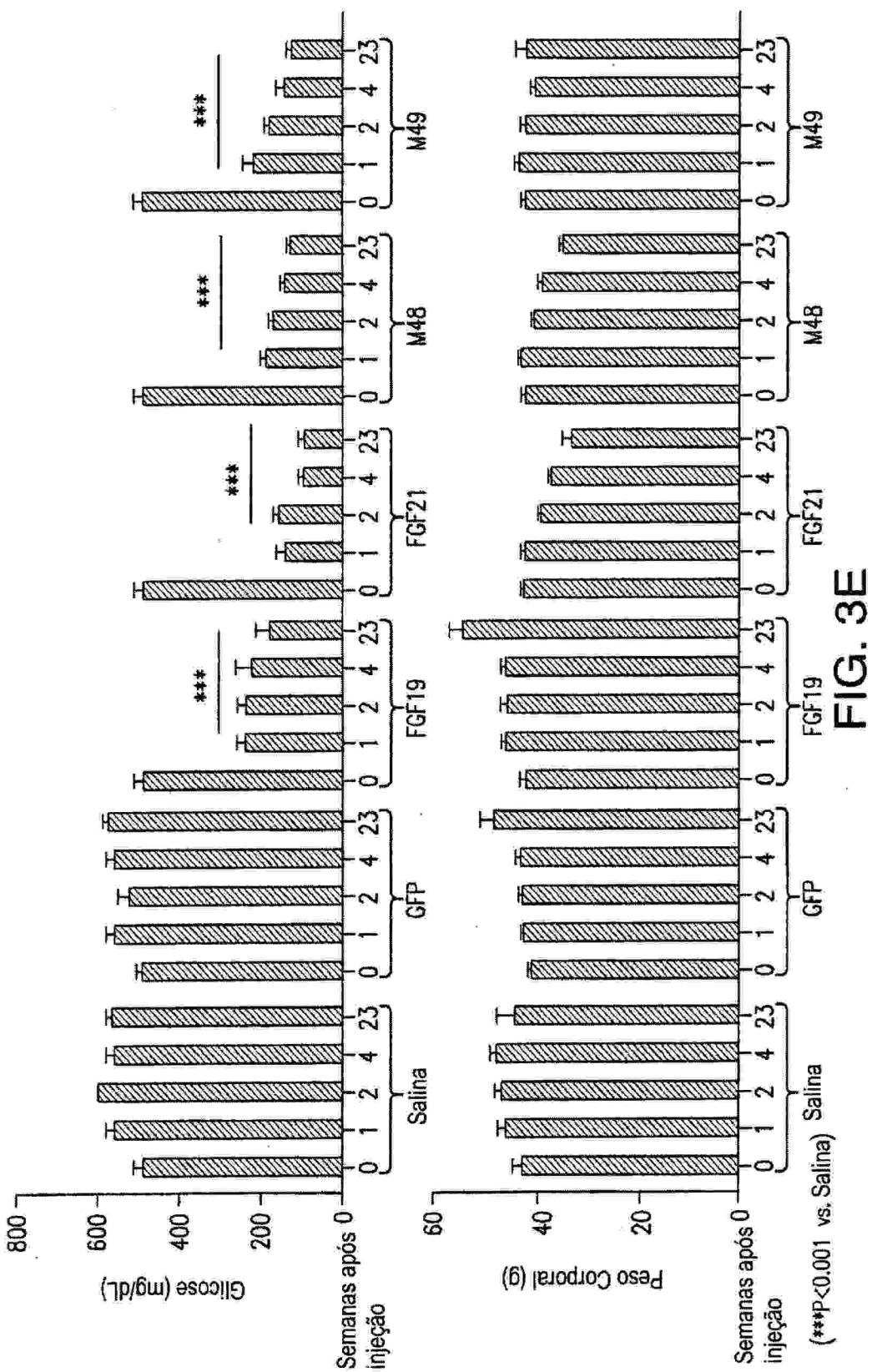
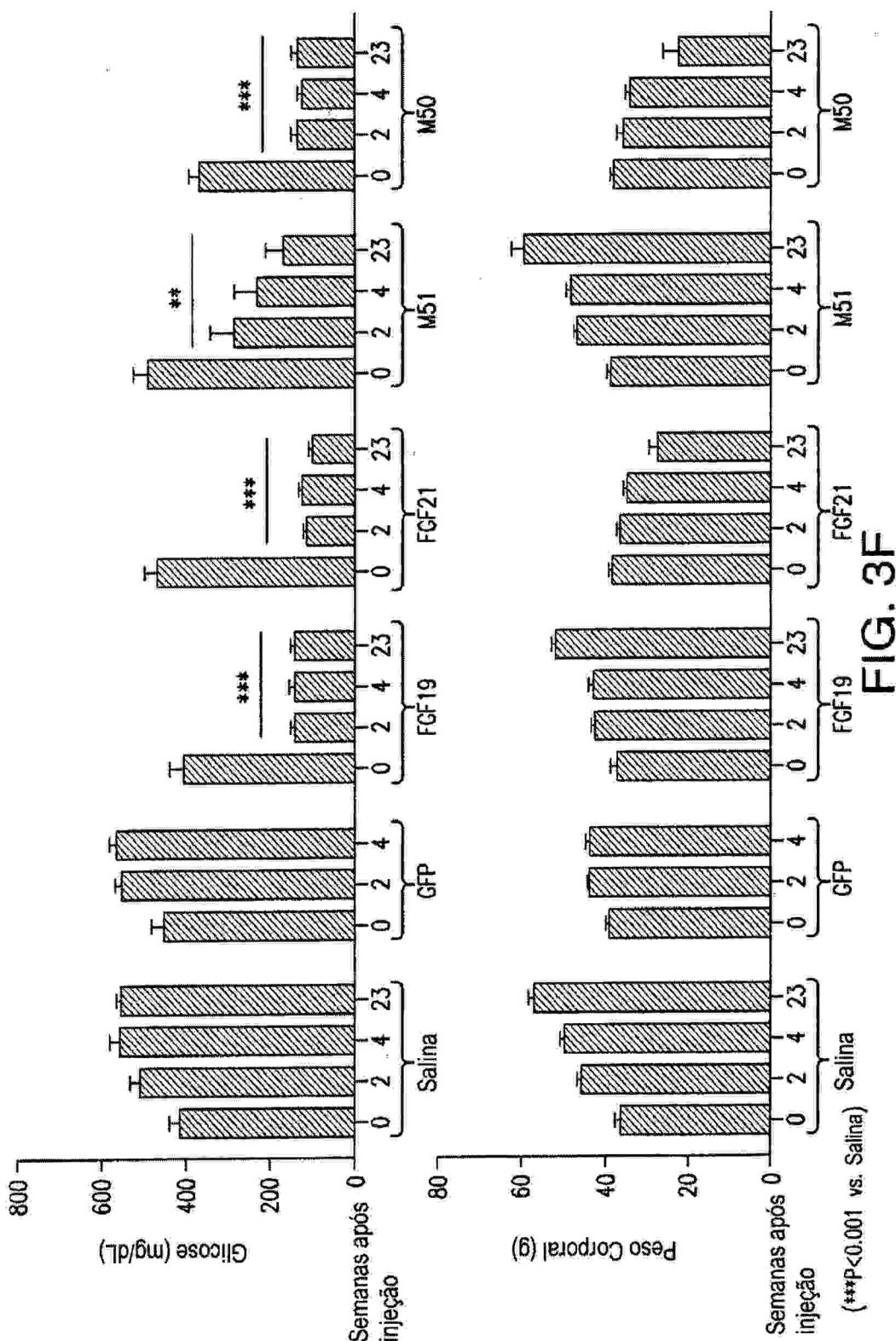


FIG. 3C







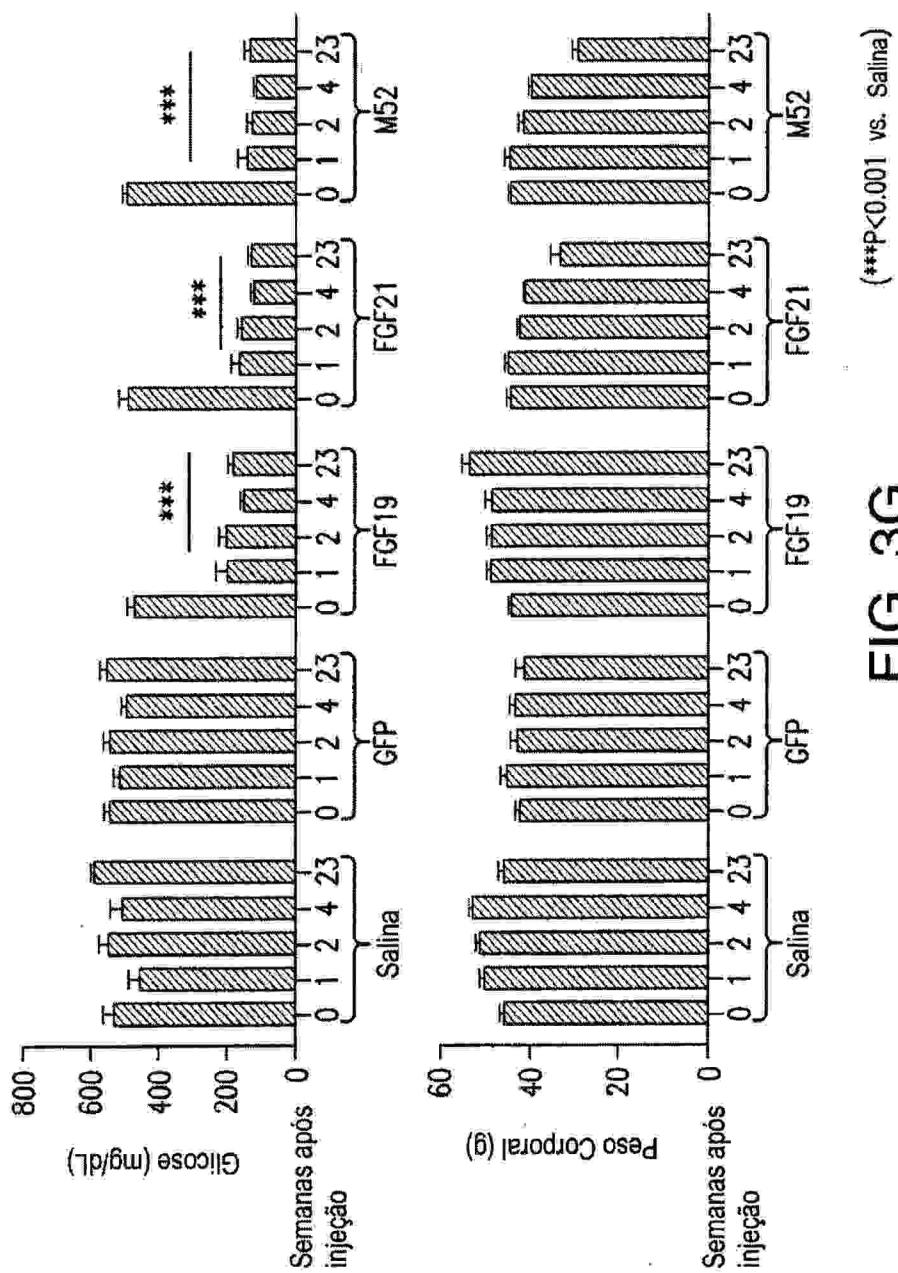


FIG. 3G

(***P<0.001 vs. Salina)

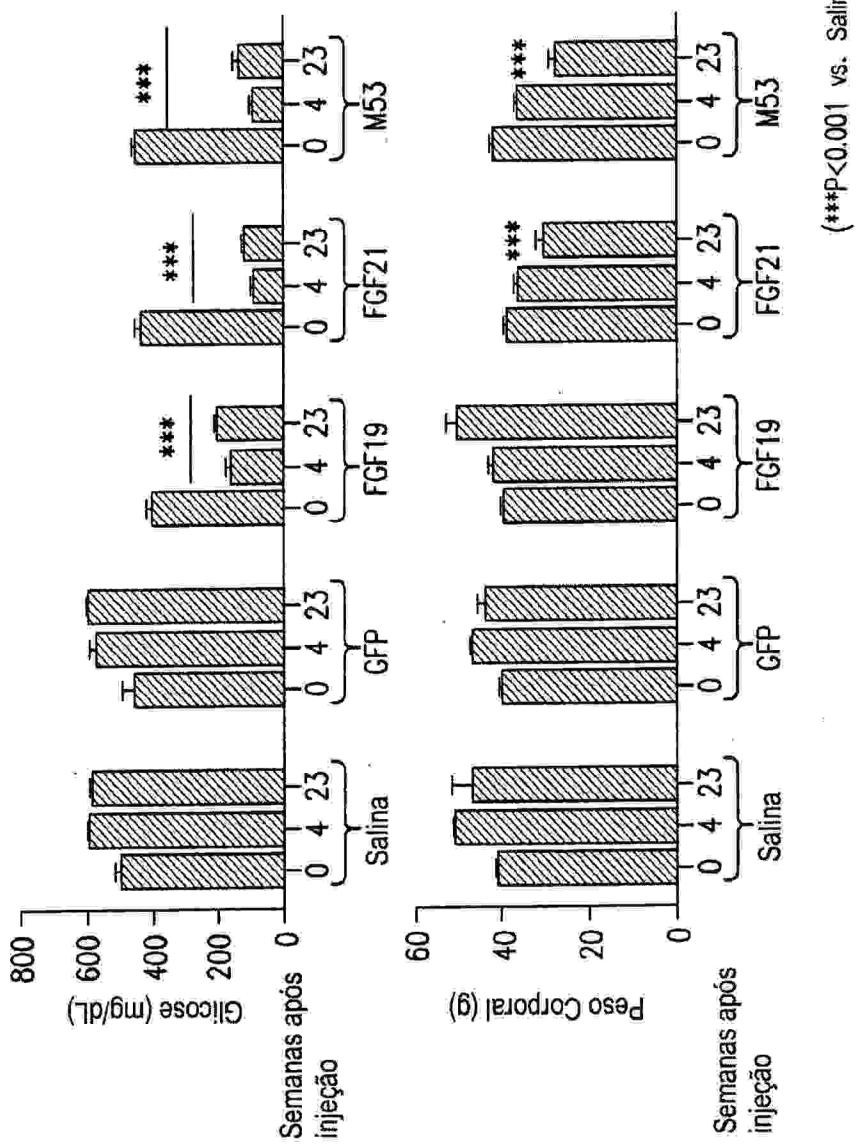


FIG. 3H

(***P<0.001 vs. Salina)

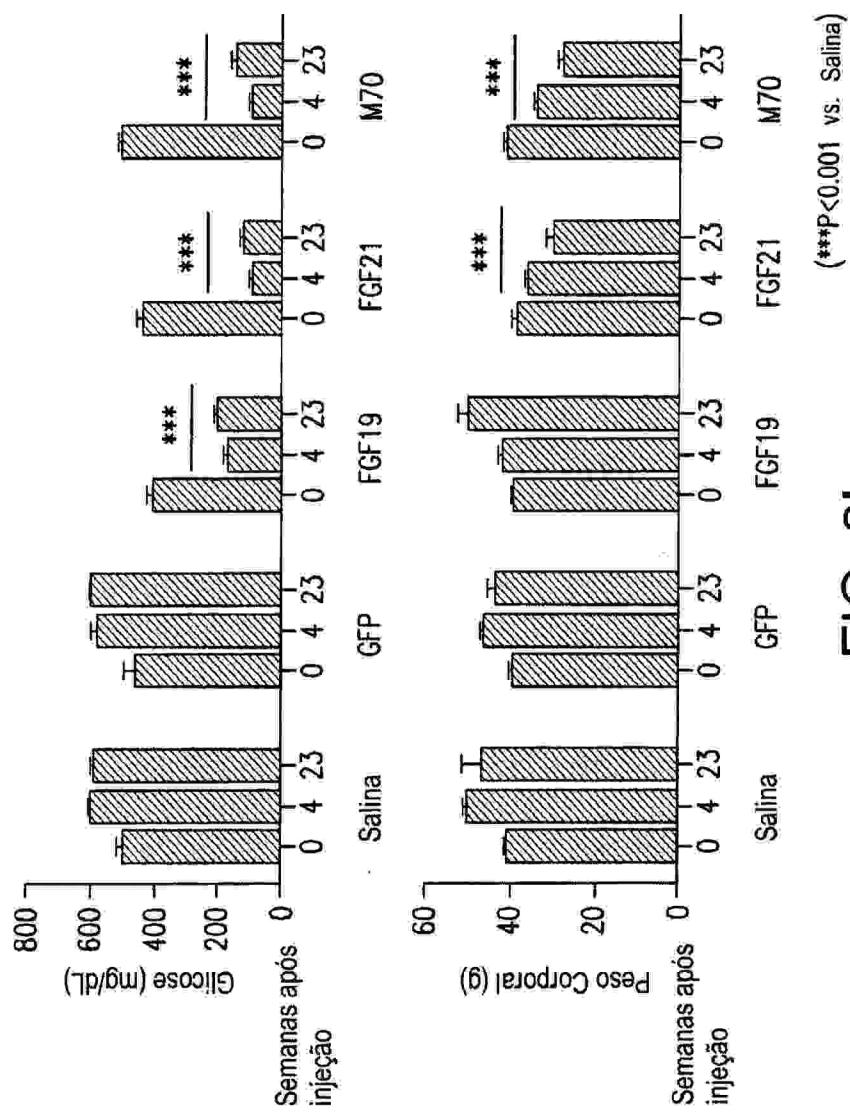


FIG. 3I

FIG. 4A

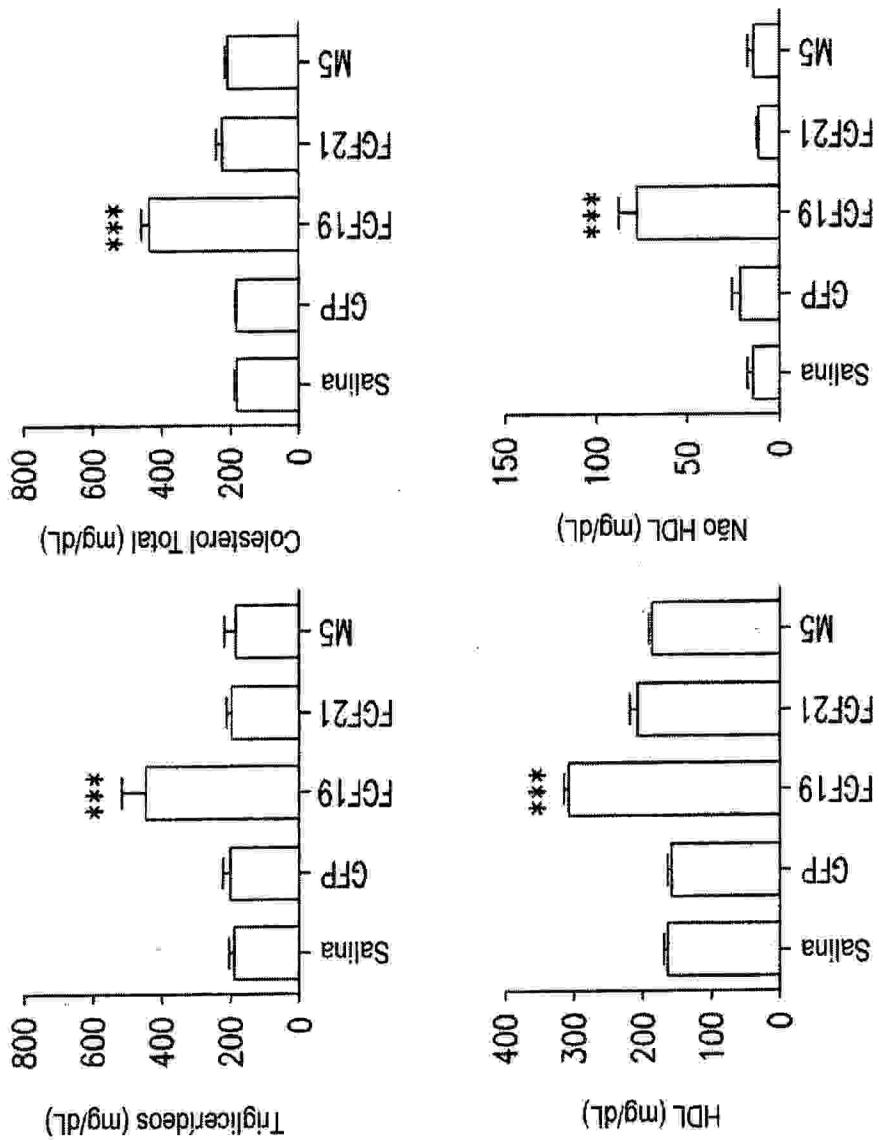


FIG. 4B

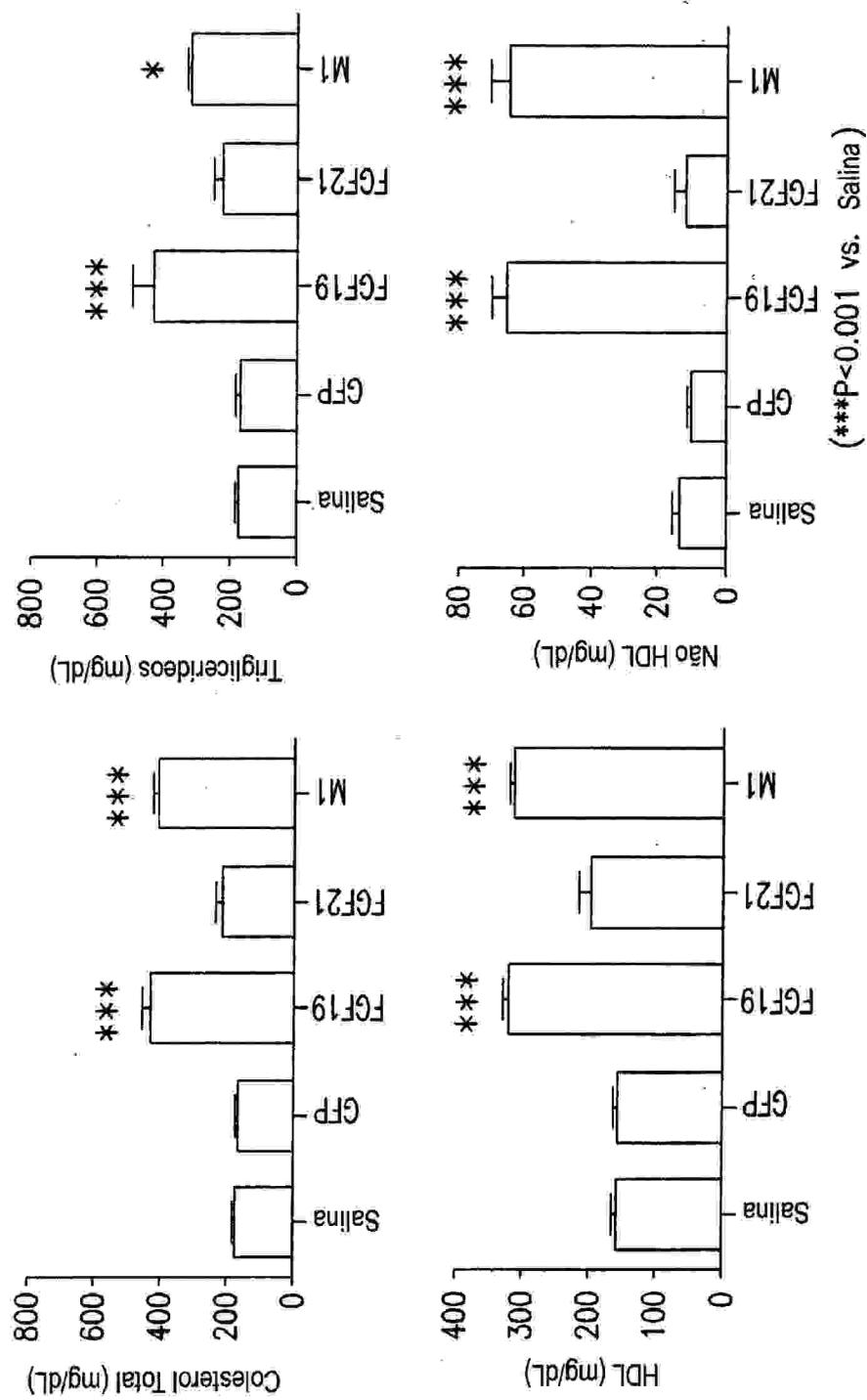


FIG. 4C

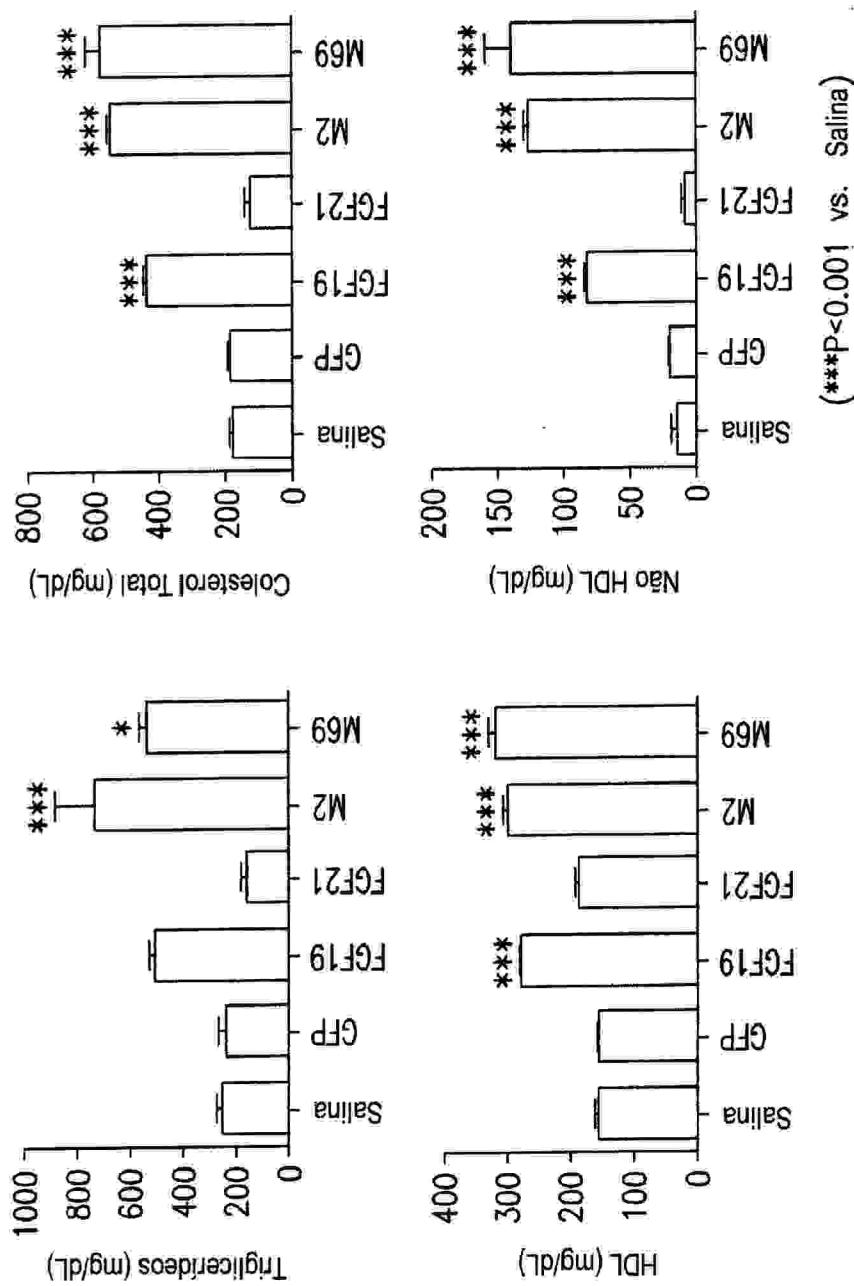
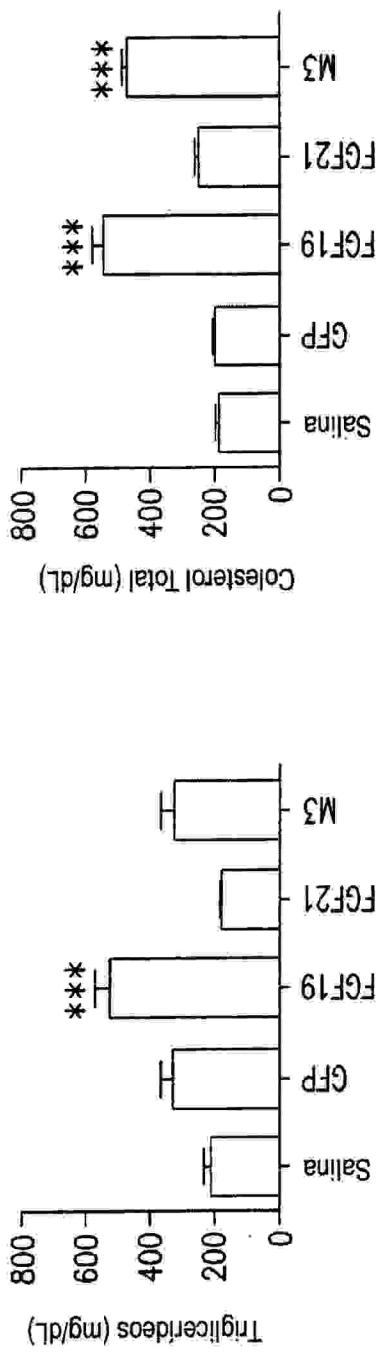
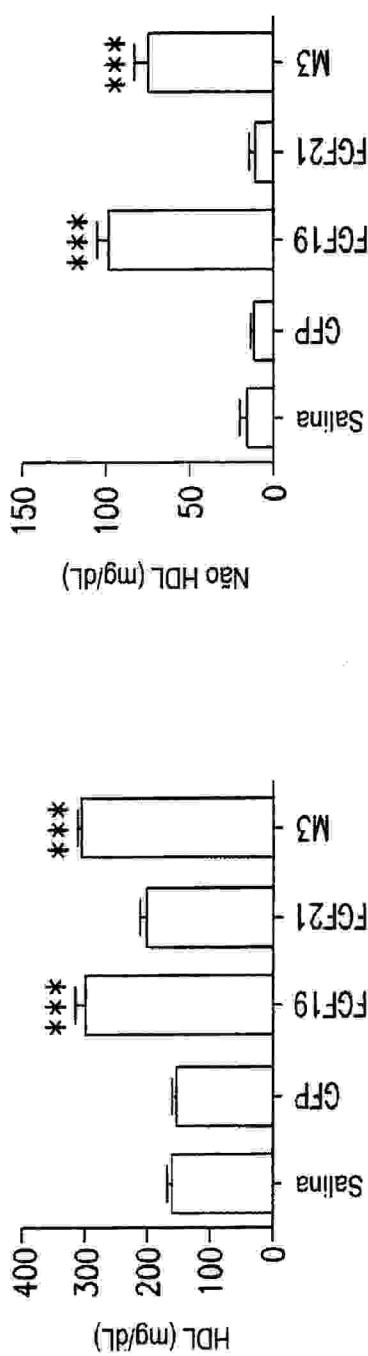


FIG. 4D

(***P<0.001 vs. Salina)



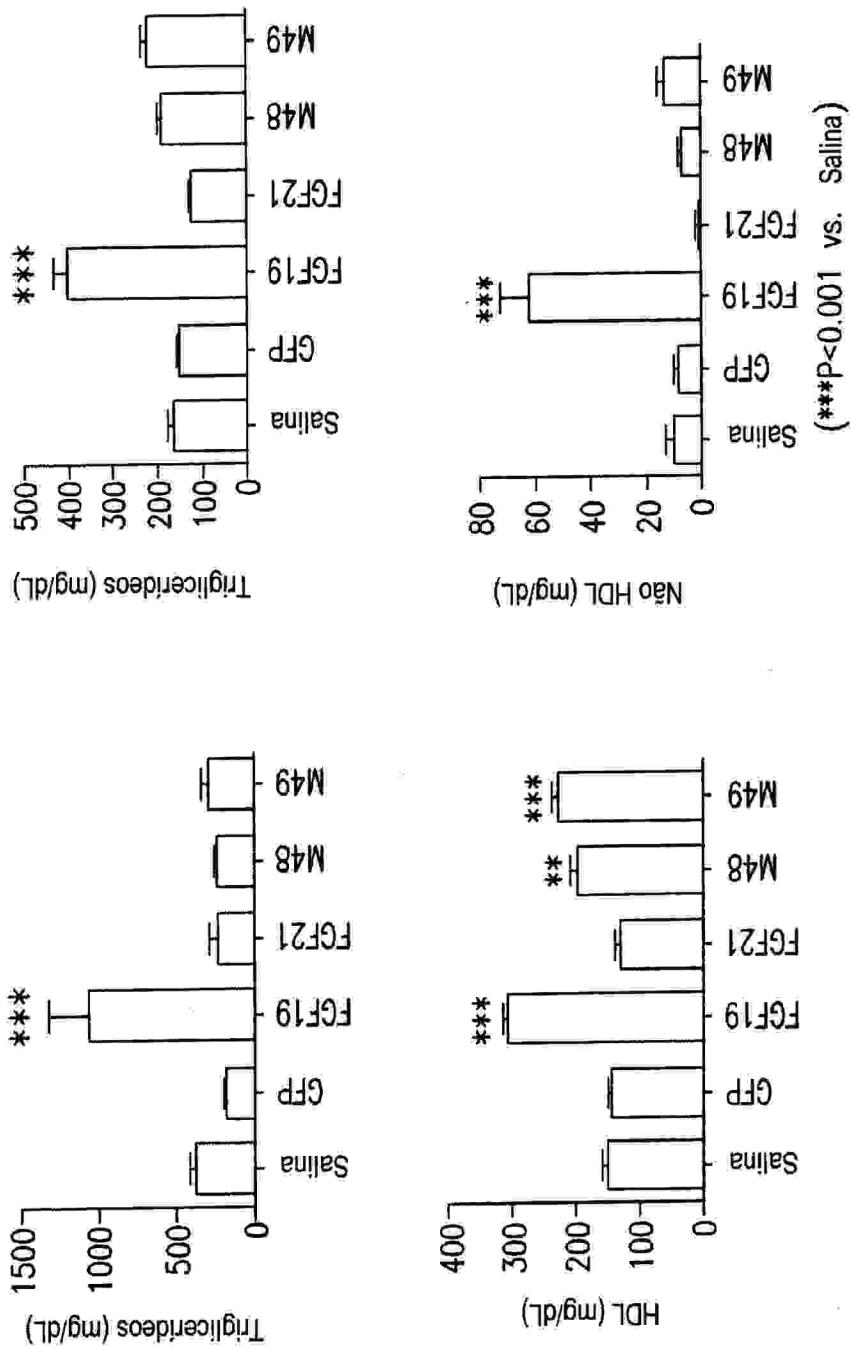
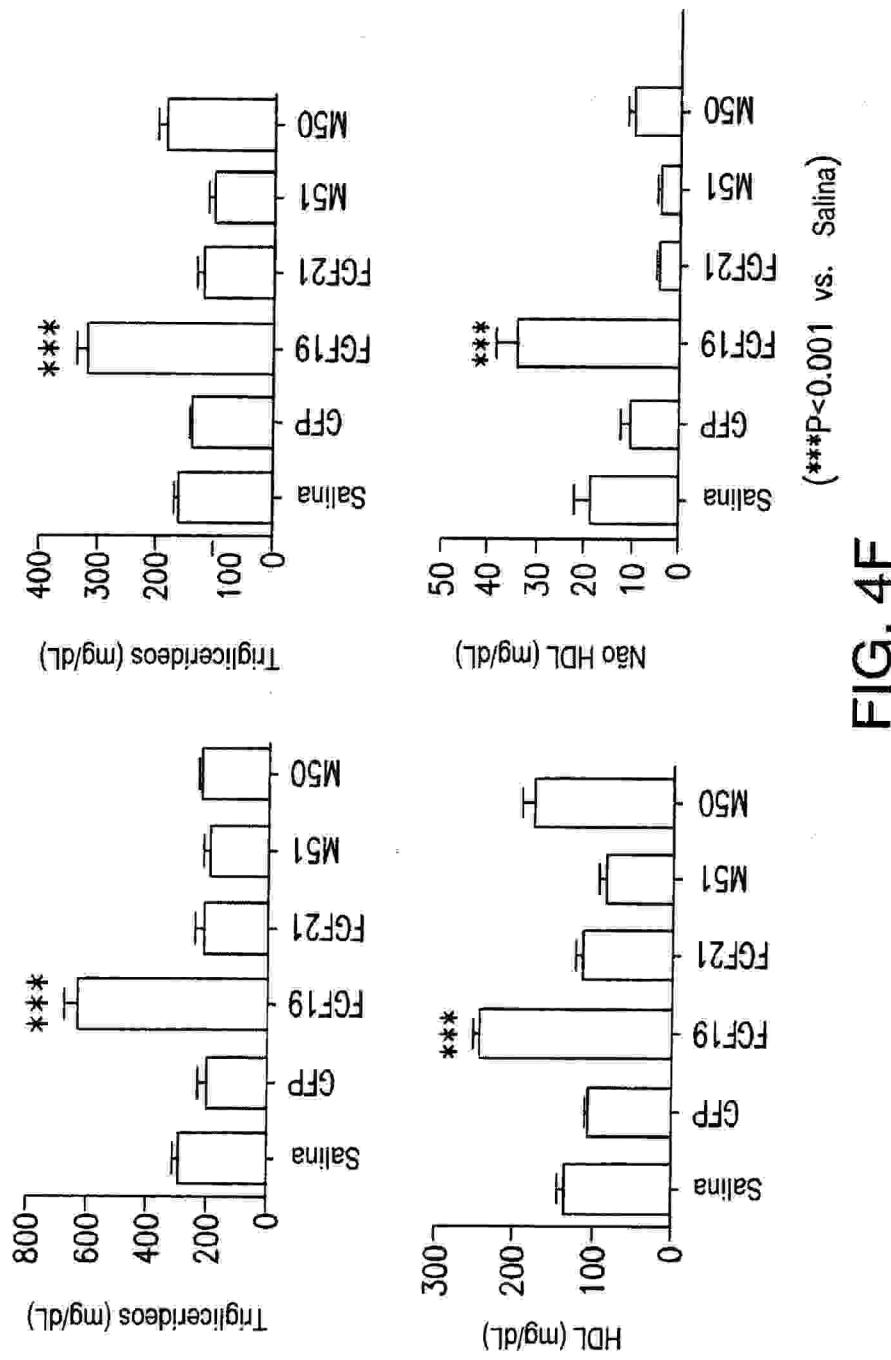


FIG. 4E



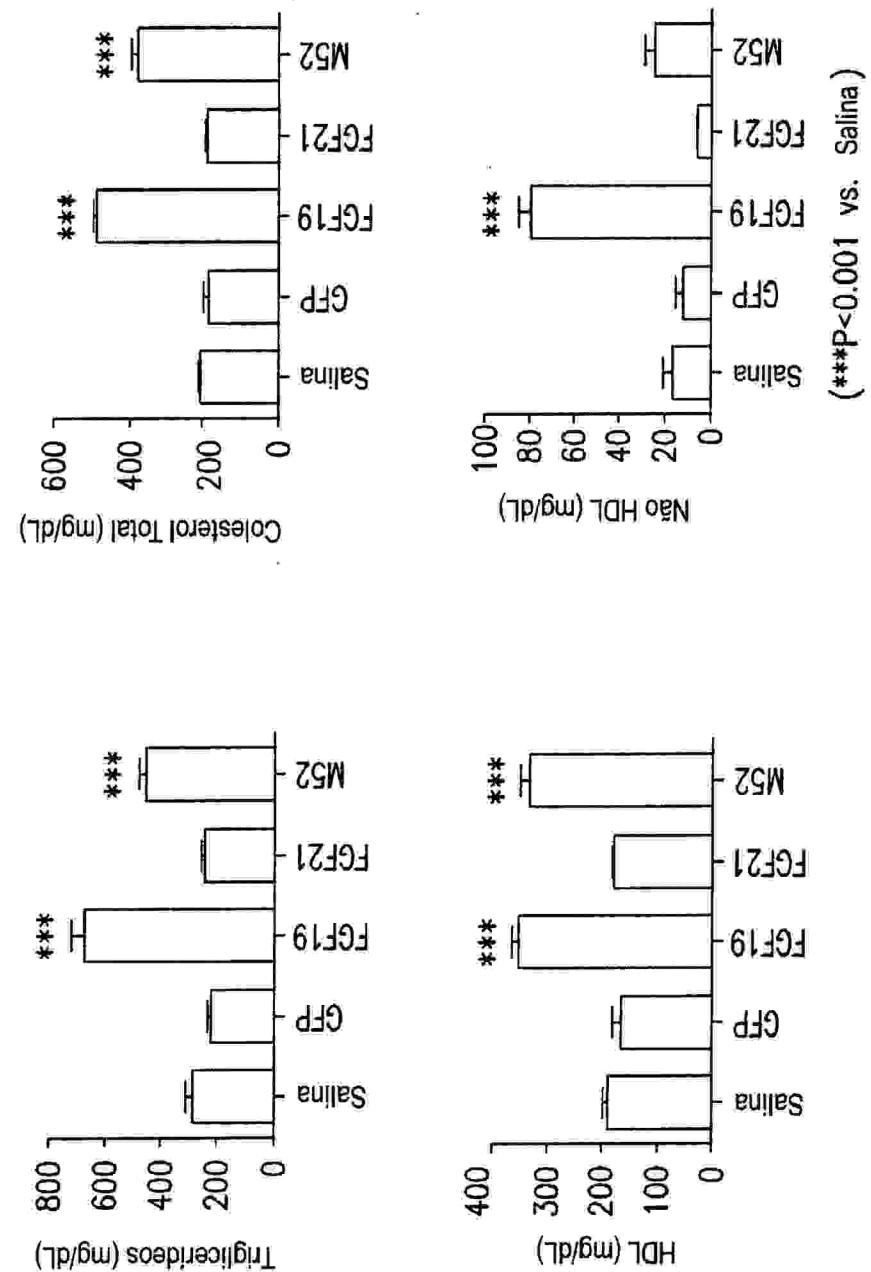


FIG. 4G

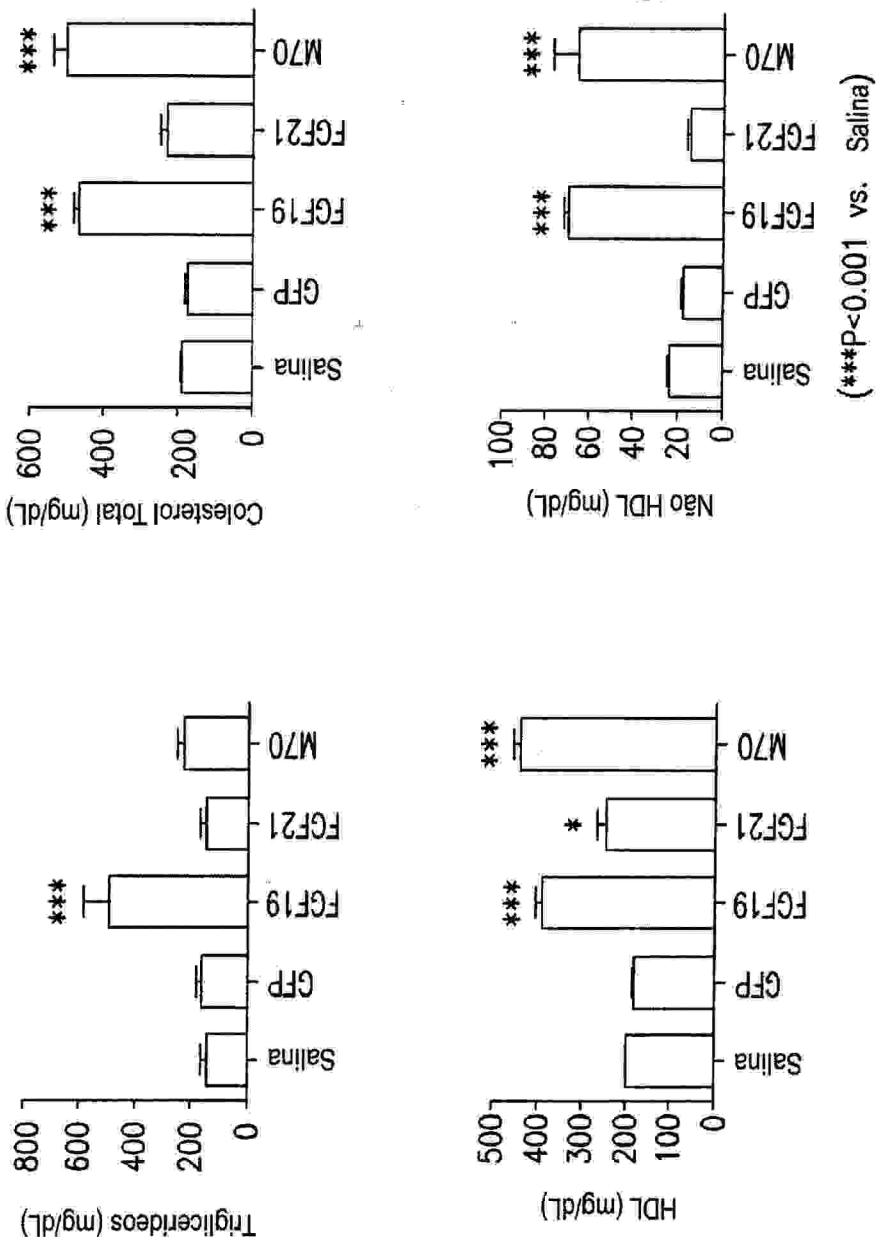
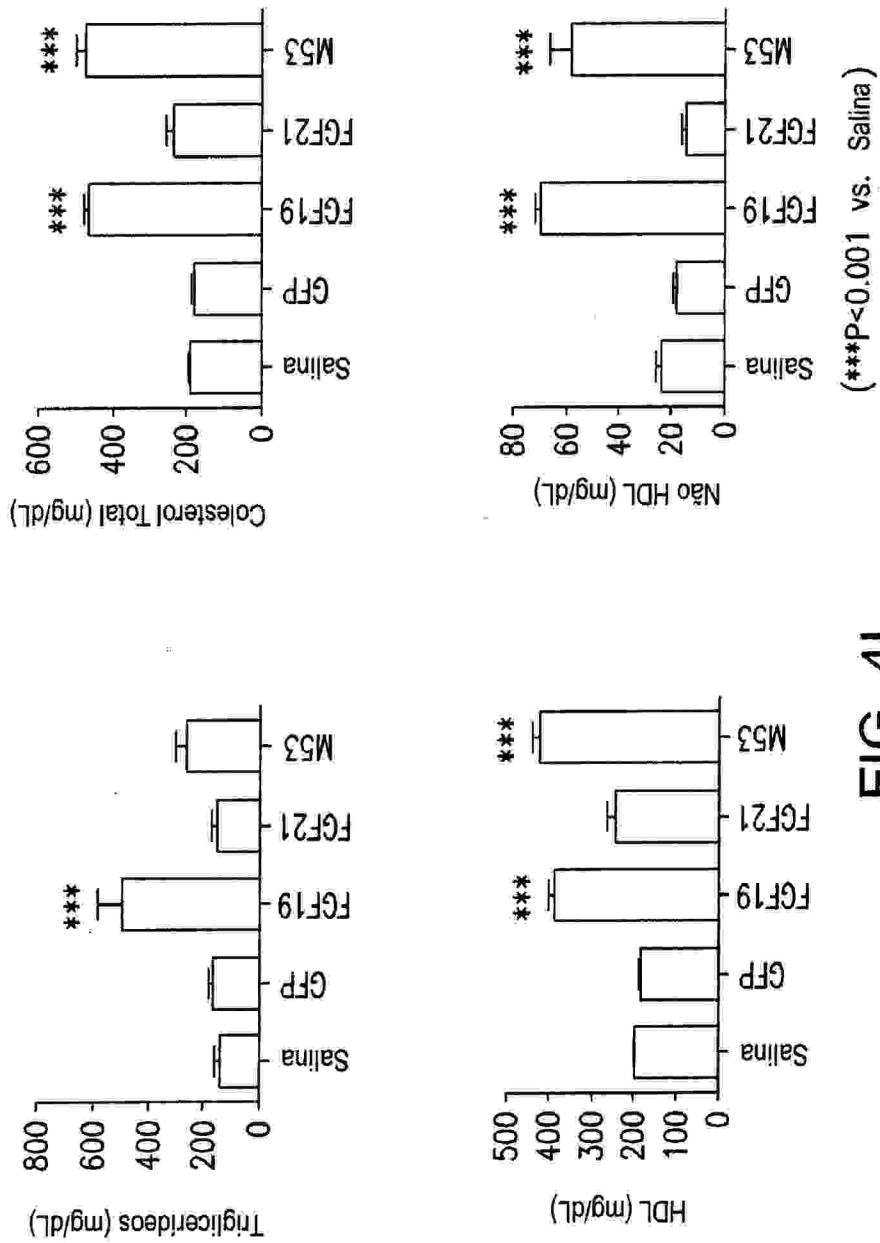
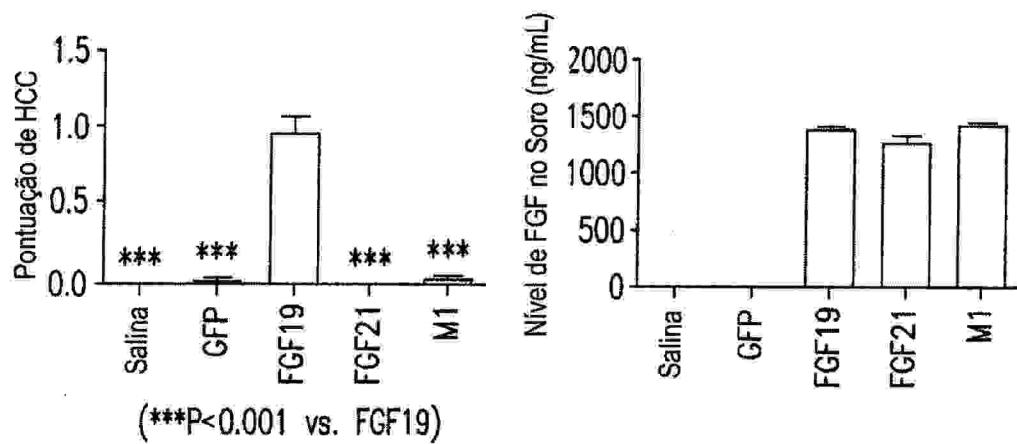
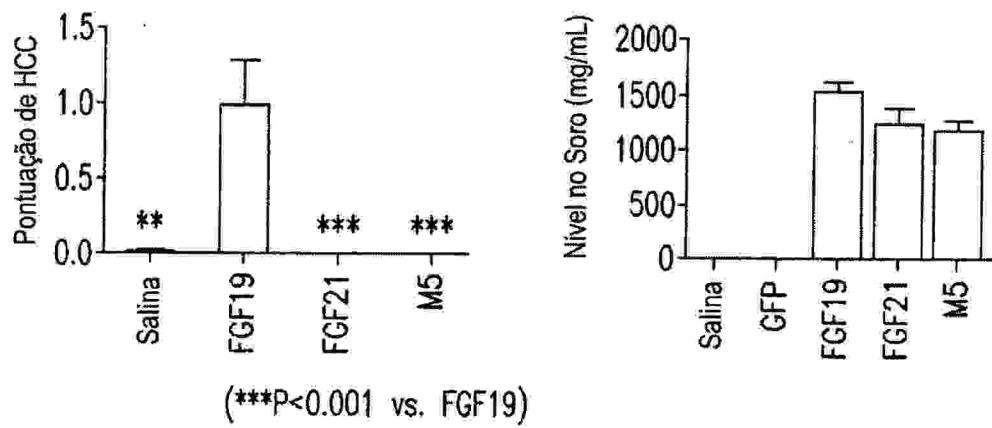


FIG. 4H

FIG. 4|





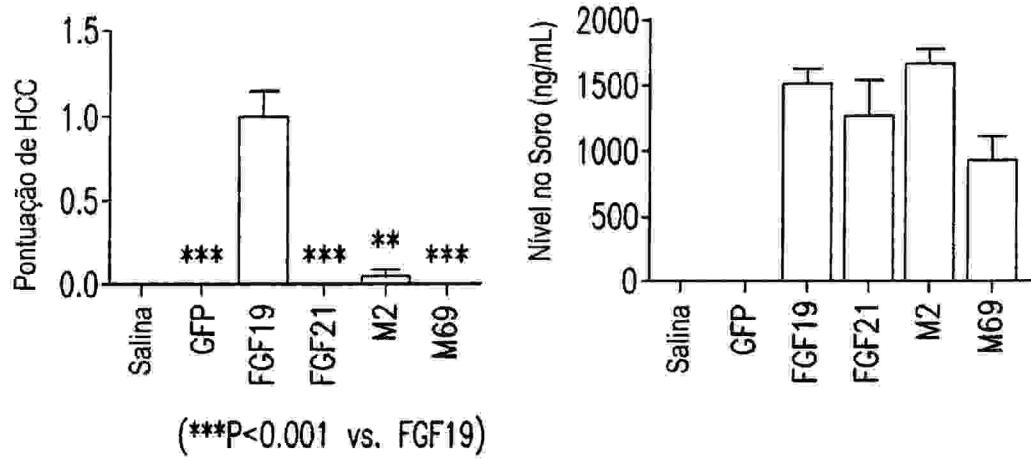


FIG. 5C

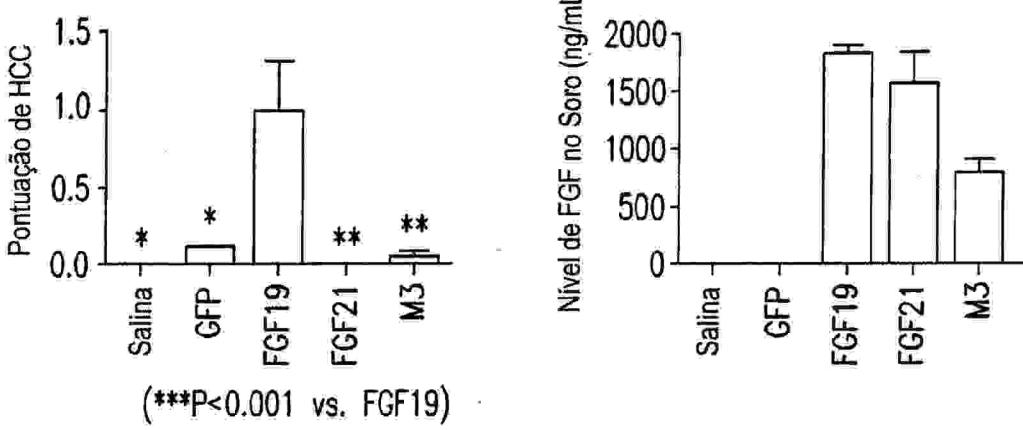


FIG. 5D

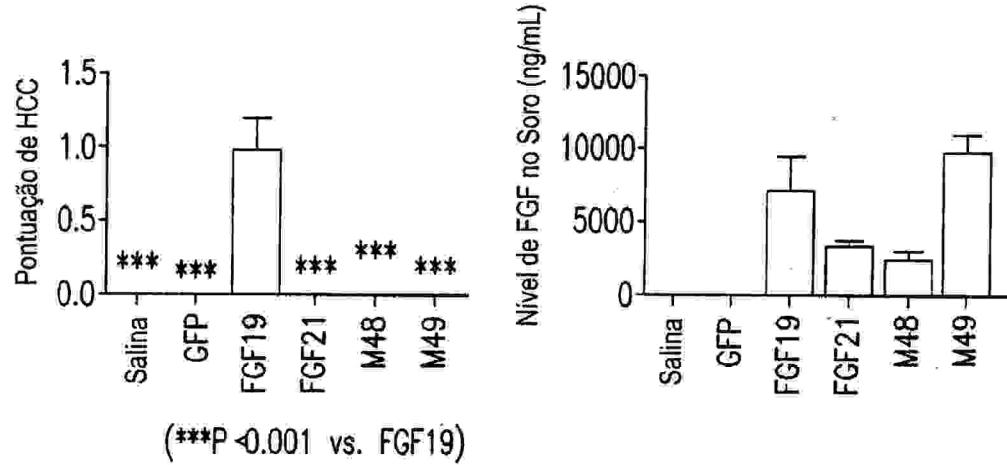


FIG. 5E

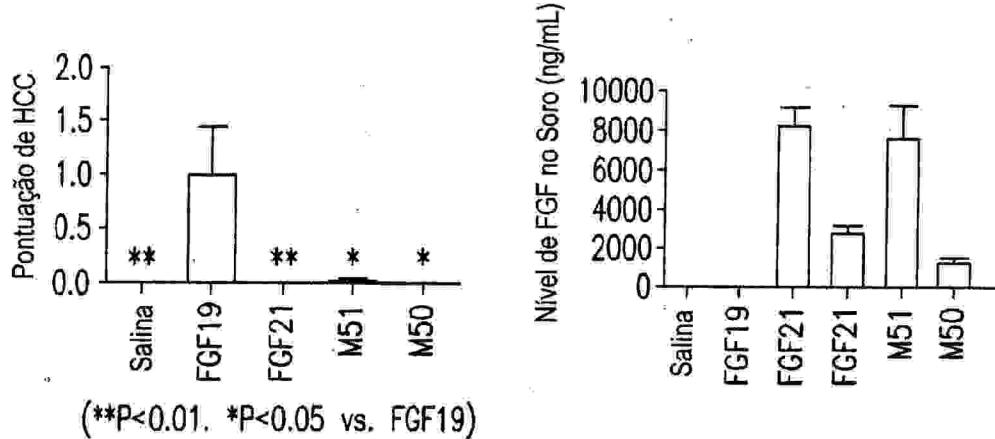


FIG. 5F

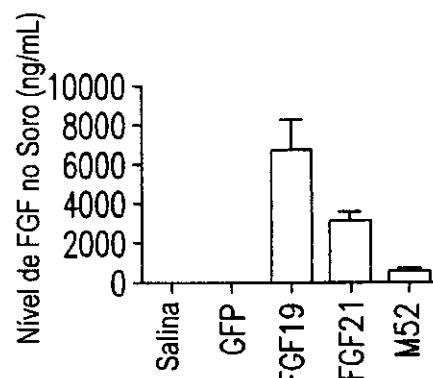
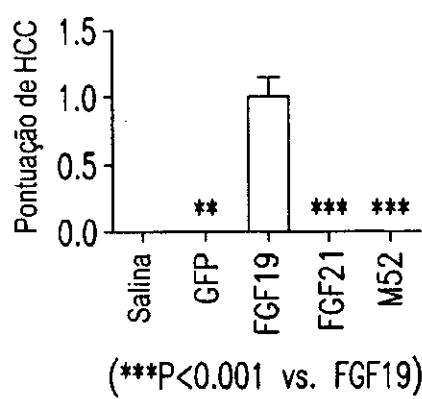


FIG. 5G

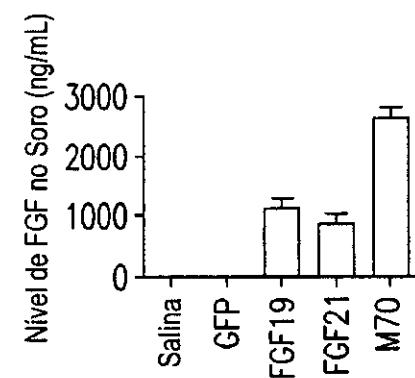
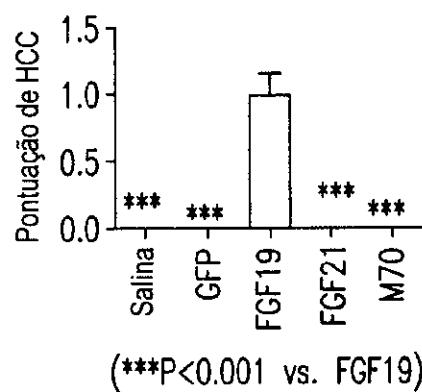


FIG. 5H

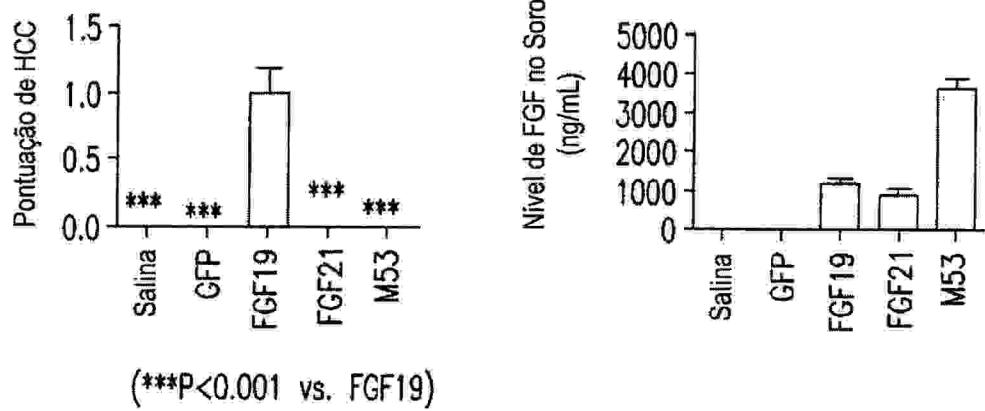


FIG. 5I

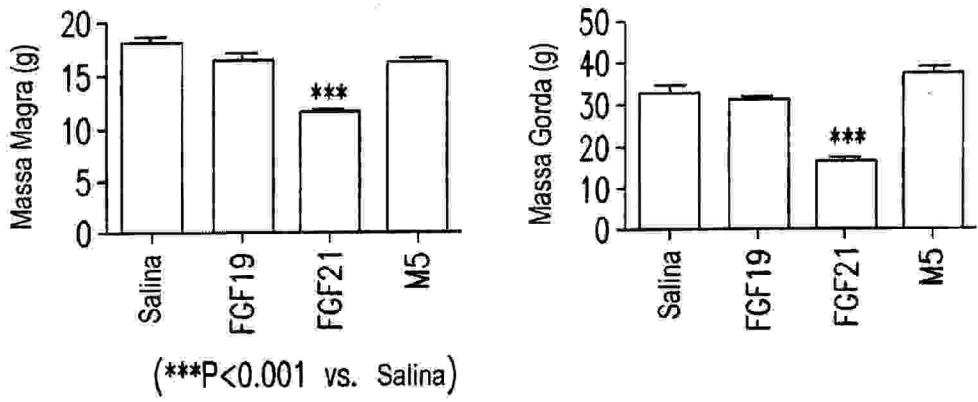


FIG. 6A

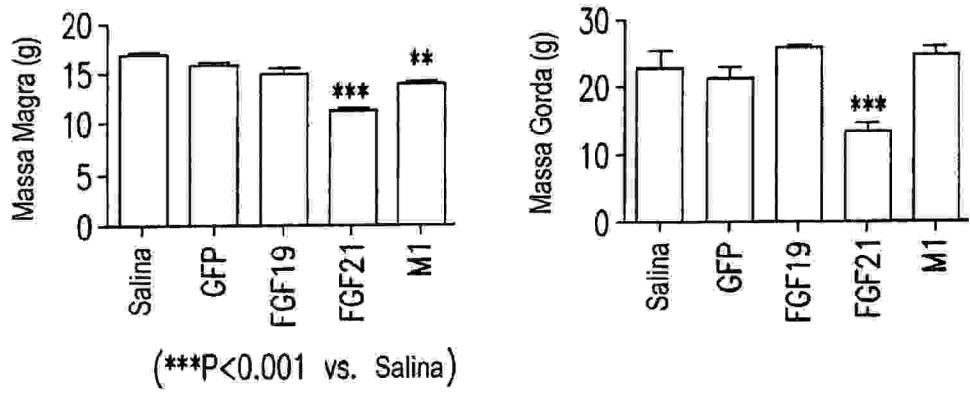


FIG. 6B

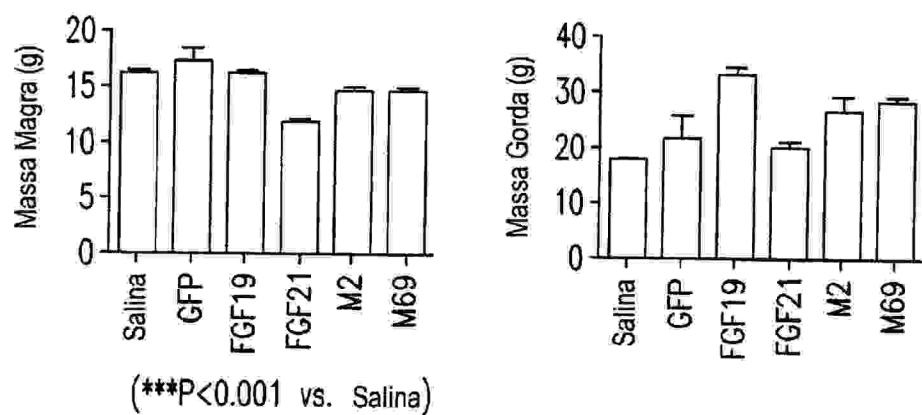


FIG. 6C

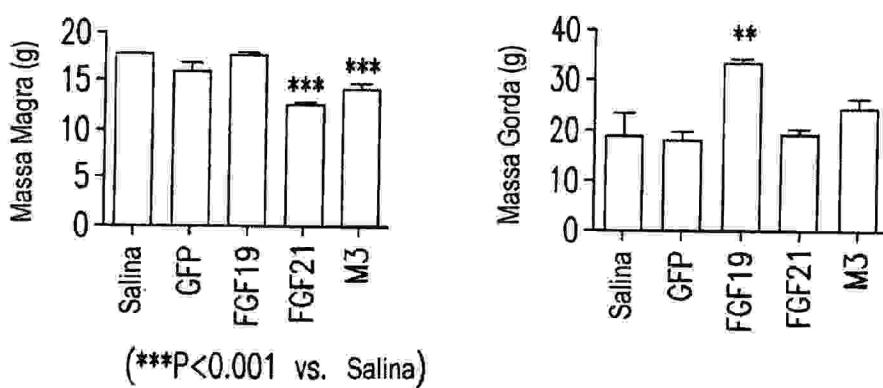


FIG. 6D

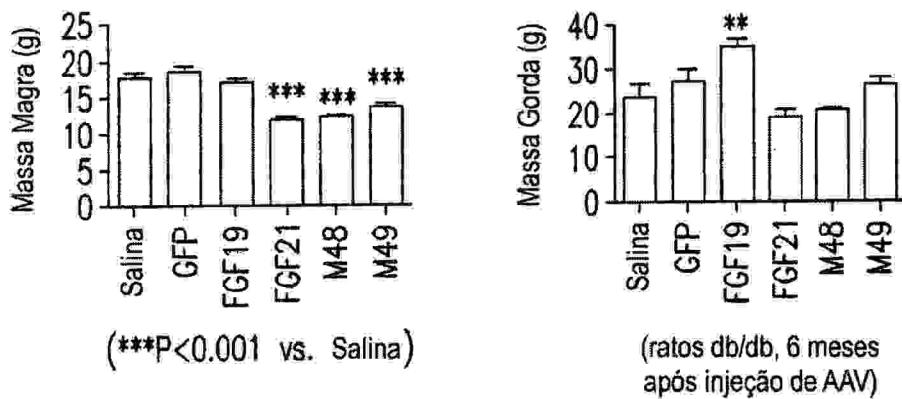


FIG. 6E

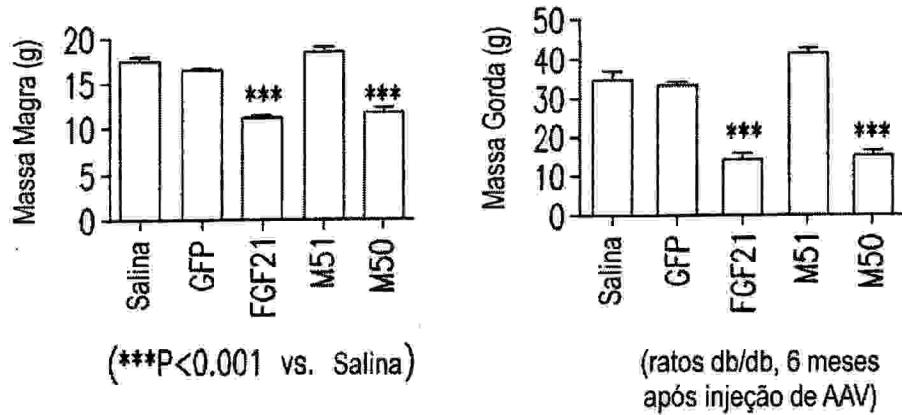


FIG. 6F

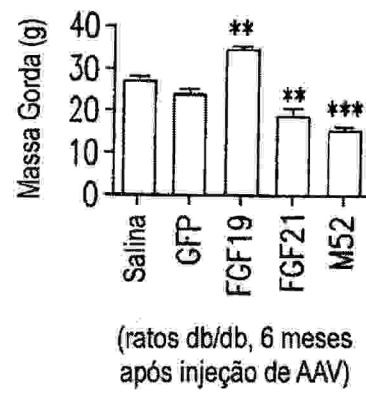
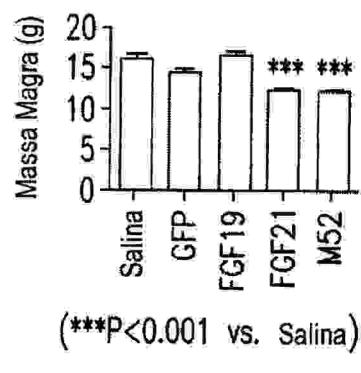


FIG. 6G

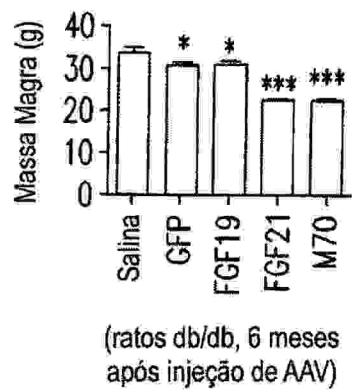
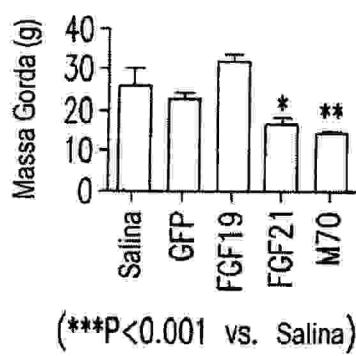


FIG. 6H

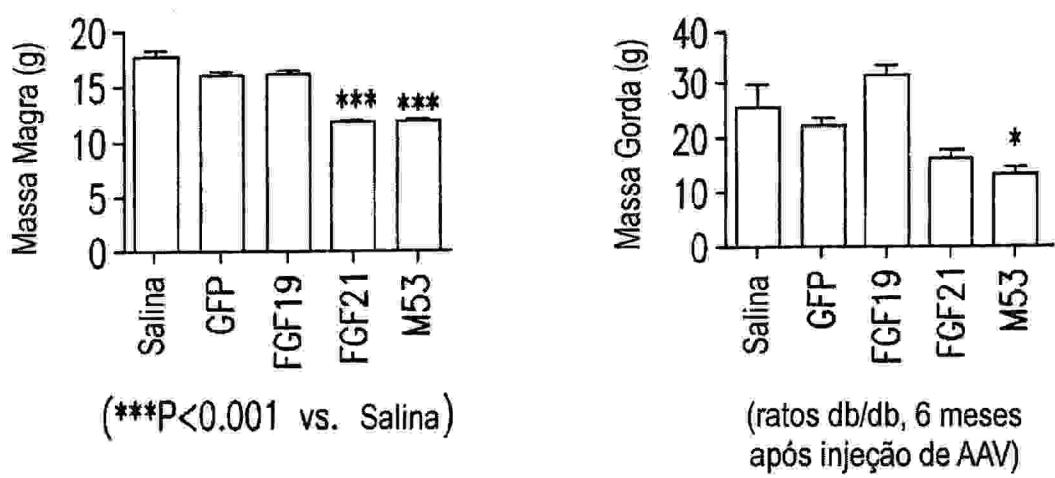


FIG. 6I

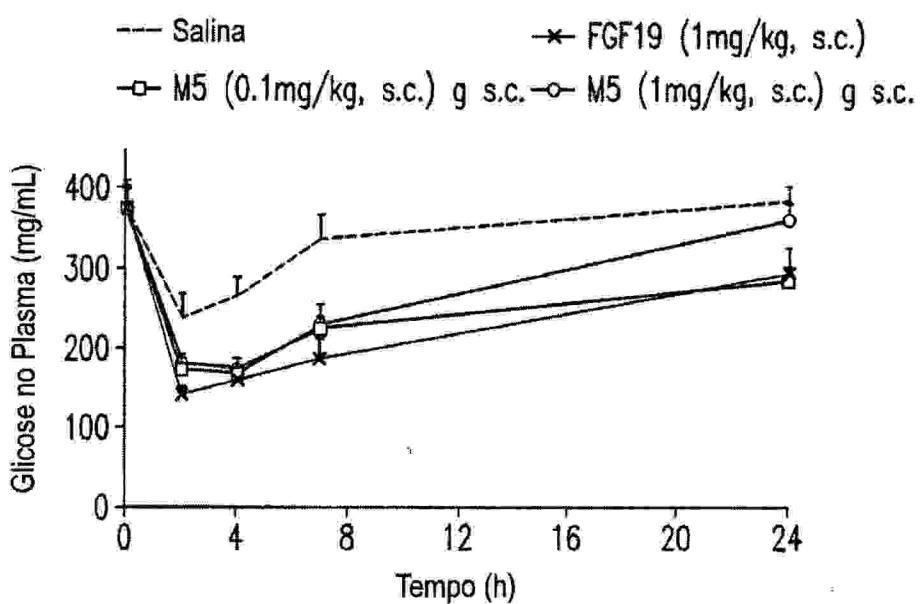


FIG. 7A

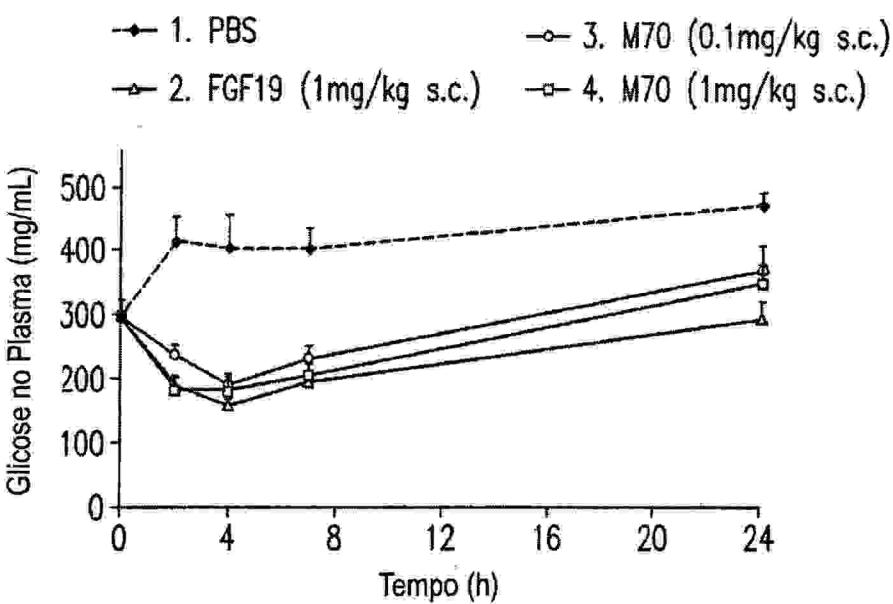


FIG. 7B

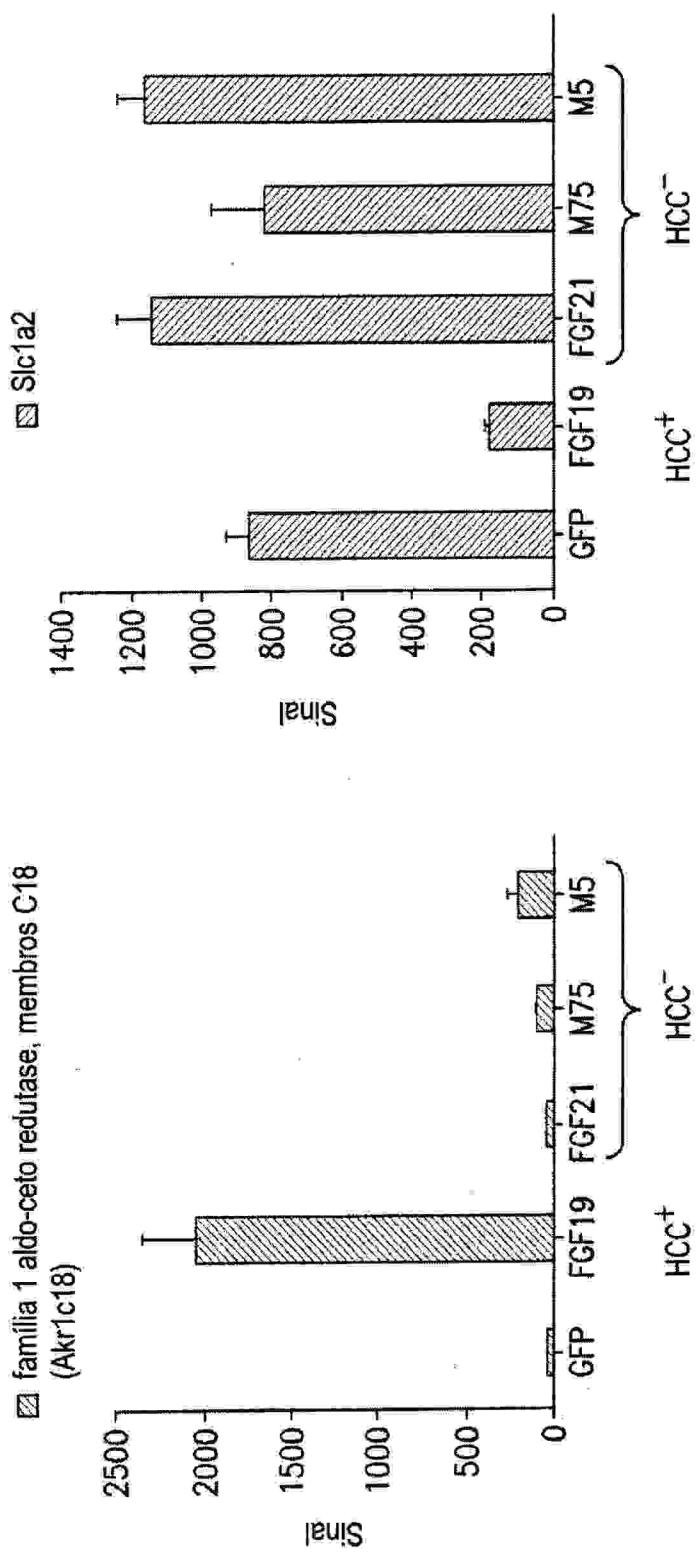


FIG. 8