

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 534**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2018** **PCT/IB2018/001112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2019** **WO19043457**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2018** **E 18852510 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2022** **EP 3678687**

54 Título: **Conjugados de péptidos de FGF-21 mutantes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

04.09.2017 US 201762553970 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.12.2022

73 Titular/es:

89BIO LTD. (100.0%)
6 Hamada Street
673340 Herzliya, IL

72 Inventor/es:

KOPEC, KARLA, K. y
LIU, PATRICK, MENGYUAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 930 534 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de péptidos de FGF-21 mutantes y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un conjugado de péptidos del Factor de Crecimiento de Fibroblastos-21 (FGF-21) mutante que comprende una fracción de polietilenglicol (PEG) unido a un péptido de FGF-21 mutante a través de una fracción de glucosilo, y los usos terapéuticos de los mismos. Un método para producir el conjugado del péptido de FGF-21 mutante y una composición farmacéutica y un contenedor que comprende el conjugado del péptido de FGF-21 mutante, también se abarcan en la presente descripción.

Antecedentes de la invención

El FGF-21 es una hormona endocrina que se encuentra naturalmente como una proteína monomérica no glucosilada. Junto con el FGF-19 y el FGF-23, el FGF-21 pertenece a la subfamilia de acción endocrina mientras que el resto de los 18 ligandos FGF de mamíferos se agrupan en cinco subfamilias de acción paracrina. Los FGF de acción endocrina, a diferencia de los FGF de acción paracrina, exhiben solo baja afinidad por el sulfato de heparina y, por tanto, pueden entrar en la circulación sanguínea. De esta manera, los FGF endocrinos son capaces de regular los procesos metabólicos, tales como la homeostasis del ácido biliar, el metabolismo hepático de las proteínas y la glucosa (FGF-19), el metabolismo de la glucosa y los lípidos (FGF-21) y la vitamina D y la homeostasis del fosfato (FGF-23).

El documento WO2010/129600 (Amgen Inc.) describe las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos mutantes de FGF-21, polipéptidos mutantes de FGF-21, composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos mutantes de FGF-21 y métodos para tratar trastornos metabólicos mediante el uso de tales ácidos nucleicos, polipéptidos o composiciones farmacéuticas.

Xu y otros. (Bioconjugate Chemistry, vol. 24, núm. 6, 2013, páginas 915-925) describe la formación de variantes pegiladas sitio-dirigidas de FGF21.

El documento WO2008/121563 (Ambrx, Inc.) describe los polipéptidos FGF-21 modificados y los usos de los mismos.

Gimeno y otros. (Trends in Endocrinology and Metabolism, vol. 25, núm. 6, 2014, páginas 303-311) describe la posible utilidad de la farmacoterapia basada en el FGF-21 para el tratamiento de trastornos metabólicos.

Dozier y otros. (International Journal of Molecular Sciences, vol. 16, núm. 11, 2015, páginas 25831-25864) es una revisión de la pegilación sitio-específica de proteínas, los métodos químicos relacionados y también contiene una discusión de las reacciones bioortogonales y el marcaje enzimático.

El documento US2012/172300 (Novo Nordisk A/S) describe los mutantes de FGF, particularmente FGF-20 y FGF-21, que contienen sitios de N-glucosilación y O-glucosilación recién introducidos.

El documento WO2016/102562 (Novo Nordisk A/S) describe un derivado de una proteína FGF-21 que tiene un residuo de cisteína en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 y en particular la posición 180 o la posición 181 del FGF-21 humano maduro y derivados del mismo que tienen una cadena lateral unida a esta cisteína. Se dice que los derivados de FGF-21 muestran una alta potencia hacia los receptores de FGF.

Resumen de la invención

Los conjugados del péptido de FGF-21 mutante que tienen propiedades sorprendentes se describen en la presente descripción. También se describen en la presente descripción composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante descritos en la presente descripción y contenedores farmacéuticos que comprenden los mismos. Más particularmente, un conjugado del péptido del Factor de Crecimiento de Fibroblastos-21 (FGF-21) mutante que comprende un péptido de FGF-21 mutante que comprende al menos un residuo de treonina adyacente a al menos un residuo de prolina (P) en el lado C-terminal de al menos un residuo de prolina, de esta manera se forma al menos un sitio de O-glucosilación que no existe en el FGF-21 nativo correspondiente, en donde el FGF-21 nativo correspondiente tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, y un polietilenglicol (PEG) de 20 kDa, en donde el PEG de 20 kDa se une covalentemente al péptido de FGF-21 mutante en al menos un residuo de treonina a través de una fracción de glucosilo como se propone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Se proporciona además un método para producir el conjugado del péptido de FGF-21 mutante y los usos del mismo en el tratamiento de al menos una de las enfermedades relacionadas con la diabetes, particularmente la diabetes tipo 2, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o el síndrome metabólico. En una modalidad más particular, la diabetes tipo 2, la NASH, o el síndrome

metabólico se tratan en un sujeto humano. También se abarca en la presente descripción el conjugado del péptido de FGF-21 mutante para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2, la NASH no alcohólica y/o el síndrome metabólico, y más particularmente la diabetes tipo 2, la NASH y/o el síndrome metabólico en un sujeto humano. En otro aspecto, el conjugado del péptido de FGF-21 mutante se usa en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 2, la NASH no alcohólica y/o el síndrome metabólico, y más particularmente la diabetes tipo 2, la NASH y/o el síndrome metabólico en un sujeto humano.

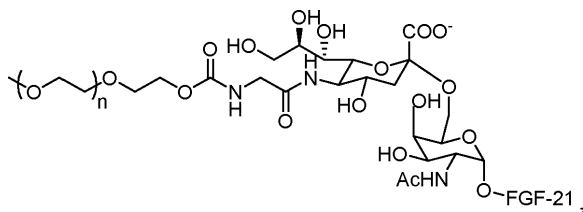
Por el contrario de las enseñanzas generales en la técnica, los presentes inventores encontraron, sorprendentemente, que la pegilación cerca del extremo C-terminal se tolera, y los conjugados de proteínas que comprenden los mismos son biológicamente activos *in vitro* e *in vivo*. Se observó además que la unión de un residuo de PEG de 20 kDa a un péptido de FGF-21 mutante generó un conjugado del péptido de FGF-21 mutante que tenía propiedades terapéuticas sorprendentes, como se demostró en una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Tales propiedades sorprendentes incluyen una semivida mejorada, que se estima que es de ~80 horas en humanos, y la capacidad de reducir al menos uno de los niveles de HbA1C (un indicador estable del índice glucémico), los niveles de triglicéridos en suero o los niveles de insulina en suero en un sujeto que lo necesita. Tales sujetos incluyen, sin limitarse a, un sujeto que se sospecha que tiene diabetes y/o una enfermedad(es) relacionada(s) (por ejemplo, diabetes tipo 2, NASH y/o síndrome metabólico) o que tiene diabetes y/o una enfermedad(es) relacionada(s) (por ejemplo, diabetes tipo 2, NASH y/o síndrome metabólico). Los conjugados del péptido de FGF-21 mutante que comprenden un residuo de PEG de 20 kDa también exhiben una alta biodisponibilidad como se refleja por una biodisponibilidad del 38 % en ratones y ratas, y una biodisponibilidad del 56 % en monos.

La presente invención se refiere a un conjugado del péptido del Factor de Crecimiento de Fibroblastos-21 (FGF-21) mutante que se describe en la presente descripción y que comprende

- I.) un péptido de FGF-21 mutante que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2,
- II.) una fracción de glucosilo, y
- III.) un polietilenglicol (PEG) de 20 kDa,

en donde el péptido de FGF-21 mutante se une a la fracción de glucosilo mediante un enlace covalente entre una treonina en la posición de aminoácido 173 de la SEQ ID NO: 2 y un primer sitio de la fracción de glucosilo y en donde la fracción de glucosilo se une al PEG de 20 kDa mediante un enlace covalente entre un segundo sitio de la fracción de glucosilo y el PEG de 20 kDa. La fracción de glucosilo comprende la estructura -GalNAc-Sia-.

El conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción que comprende la fracción de PEG de 20 kDa se une a la fracción de glucosilo mediante un enlace covalente a un enlazador, en donde el enlazador comprende glicina (Gly). Específicamente, el conjugado del péptido de FGF-21 mutante comprende la estructura -GalNAc-Sia-Gly-PEG (20 kDa) y comprende la estructura:



en donde n es un número entero seleccionado de 450 a 460.

En otro aspecto, se presenta una composición farmacéutica que comprende una cualquiera de, o al menos uno, de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante descritos en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. El conjugado del péptido de FGF-21 mutante puede presentarse en la composición farmacéutica en una concentración en un intervalo de 0,1 mg/ml a 50 mg/ml, particularmente de 1 mg/ml a 45 mg/ml, más particularmente de 10 mg/ml a 40 mg/ml, muy particularmente en una concentración de 26 ± 4 mg/ml. En una modalidad particular, la composición farmacéutica comprende además un agente tampón, particularmente un tampón Tris. En otra modalidad, el agente tampón está presente en una concentración de 1 mM a 100 mM, particularmente de 2 mM a 75 mM, más particularmente de 5 mM a 50 mM, incluso más particularmente de 10 mM a 25 mM, muy particularmente de 16 ± 2 mM. Más particularmente, el pH está en el intervalo de 6,0 a 8,5, particularmente de 6,5 a 8,0, más particularmente de 6,75 a 8,0, y muy particularmente es $7,5 \pm 0,3$. En otra modalidad particular, la composición farmacéutica comprende además una sal, particularmente una sal inorgánica, más particularmente NaCl. Más particularmente, la sal está presente en una concentración de 30 mM a 200 mM, particularmente de 40 mM a 150 mM, más particularmente de 50 mM a 100 mM, muy particularmente de 56 ± 2 mM. La composición farmacéutica puede comprender además un agente modificador de la tonicidad. Tales agentes modificadores de la tonicidad incluyen, sin limitarse a, glicerol, aminoácidos, cloruro de sodio, proteínas, azúcares y alcoholes de azúcar, particularmente el agente modificador de la tonicidad es un azúcar, más particularmente el agente modificador de la tonicidad es la sacarosa. En otra modalidad, el agente modificador de la tonicidad está

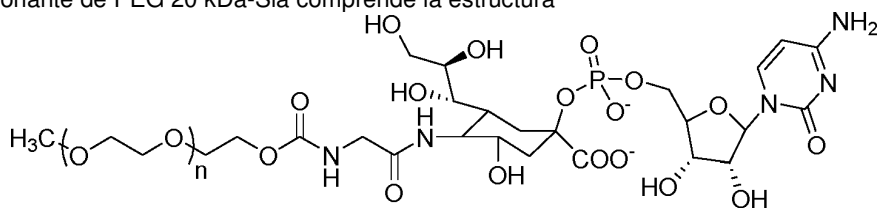
presente en una concentración de 50 mM a 200 mM, más particularmente en una concentración de 100 mM a 175 mM, incluso más particularmente está presente en una concentración de 135 mM a 160 mM, y muy particularmente en una concentración de 150 ± 2 mM. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende además un surfactante, particularmente un surfactante no iónico, en donde el surfactante o el surfactante no iónico es un surfactante no iónico a base de polisorbato, particularmente polisorbato 20 o polisorbato 80, más particularmente polisorbato 20. En una modalidad particular, el surfactante o surfactante no iónico está presente en una concentración de 0,01 mg/ml a 1 mg/ml, particularmente en una concentración de 0,05 a 0,5 mg/ml y más particularmente en una concentración de $0,2 \pm 0,02$ mg/ml.

En una modalidad ilustrativa, la composición farmacéutica comprende 0,1 mg/ml a 50 mg/ml del conjugado del péptido de FGF-21 mutante, agente tampón de 1 mM a 100 mM, particularmente tampón Tris, sal de 30 mM a 200 mM, particularmente NaCl, agente modificador de la tonicidad de 50 mM a 200 mM, particularmente sacarosa, y surfactante o surfactante no iónico de 0,01 mg/ml a 1 mg/ml, particularmente polisorbato 20, y tiene un pH de 6,0 a 8,5.

También se abarca en la presente descripción un contenedor farmacéutico que comprende uno cualquiera de, o al menos uno, de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante descritos en la presente descripción o una composición farmacéutica que comprende los mismos. Tales contenedores farmacéuticos ilustrativos incluyen, sin limitarse a, una jeringa, un vial, una botella de infusión, una ampolla, un carpule, una jeringa equipada con un sistema de protección de la aguja o un carpule dentro de una pluma de inyección.

En un aspecto adicional, se presenta un método para producir un conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción, que comprende las etapas de:

- (1) producir de forma recombinante el péptido de FGF-21 mutante en un huésped de expresión; y
- (2) unir enzimáticamente al péptido de FGF-21 mutante de la etapa (1) una fracción de PEG-glucosilo, en donde el PEG tiene 20 kDa, de esta manera se forma el conjugado del péptido de FGF-21 mutante. En una modalidad particular, el huésped de expresión es *Escherichia coli*. En otra modalidad particular del método, la etapa (2) comprende una etapa (2a) de poner en contacto el péptido de FGF-21 mutante con un donante de GalNAc y una GalNAc transferasa en condiciones adecuadas para transferir GalNAc del donante de GalNAc a la treonina en la posición de aminoácido 173 de la SEQ ID NO: 2. En una modalidad aún más particular, el donante de GalNAc es UDP-GalNAc. En otra modalidad más particular, la GalNAc transferasa es la MBP-GalNAcT2. En otra modalidad particular del método, la etapa (2) comprende además una etapa (2b) de poner en contacto el producto de la etapa (2a), con un donante de PEG 20 kDa-Sia y una sialiltransferasa en condiciones adecuadas para transferir el PEG 20 kDa-Sia de un donante de PEG 20 kDa-Sia a una GalNAc unida al residuo de treonina en la posición de aminoácido 173 de la SEQ ID NO: 2. En una modalidad particular adicional del método, el donante de PEG 20 kDa-Sia es el PEG 20 kDa-Sia-CMP. En una modalidad aún más particular del método, la sialiltransferasa es la ST6GalNAc1. En una modalidad incluso más particular del método, el donante de PEG 20 kDa-Sia comprende la estructura



en donde n es un número entero seleccionado de 450 a 460.

En otra modalidad particular del método, el método comprende además una etapa (3), después de la etapa (1) y antes de la etapa (2), de purificar el péptido de FGF-21 mutante después de la producción recombinante. El método puede comprender además una etapa (4), después de la etapa (2), de purificar el conjugado del péptido de FGF-21 mutante formado en la etapa (2). En una modalidad particular, la etapa (3) comprende someter el péptido de FGF-21 mutante, y/o la etapa (4) comprende someter el conjugado del péptido de FGF-21 mutante, a un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, filtración y sus combinaciones. La etapa de purificación puede comprender una o más etapas de la cromatografía de intercambio iónico, particularmente dos etapas de la cromatografía de intercambio iónico. En una modalidad particular de la misma, la cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio aniónico, particularmente una cromatografía de intercambio aniónico fuerte. En una modalidad particular de la misma, la cromatografía de intercambio aniónico emplea un miembro seleccionado del grupo que consiste en una matriz base de éter polivinílico hidrófilo, matriz polimérica de poliestireno/divinilbenceno, trimetilamonioetil (TEAE), dietilaminoetanol (DEAE), agarosa, una cromatografía de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario (Q) y sus combinaciones. En otra modalidad particular de la misma, la etapa (3) comprende dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico mediante el uso de una matriz base de éter polivinílico hidrófilo. En otra modalidad particular de la misma, la etapa (4) comprende dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario (Q). En una modalidad particular, la arginina se añade en la etapa (2) y/o, si está presente, en la etapa

(3), particularmente al menos 400 mM de arginina. En otra modalidad particular, el método comprende además una etapa (5), después de la etapa (3) y antes de la etapa (2), de eliminación de endotoxinas, en donde el producto de la etapa (3) se filtra mediante el uso de un filtro de eliminación de endotoxinas.

- 5 También se abarca en la presente descripción un conjugado del péptido de FGF-21 mutante que puede obtenerse mediante uno cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.

También se abarca en la presente descripción uno cualquiera de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante descritos en la presente descripción o una composición farmacéutica que comprende el mismo para su uso en un método para tratar la diabetes o una enfermedad relacionada con la diabetes. La diabetes o la enfermedad relacionada con la diabetes pueden comprender al menos una entre la diabetes tipo 2, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), o el síndrome metabólico. En una modalidad particular, la diabetes o la enfermedad relacionada con la diabetes afectan a un sujeto humano. En una modalidad más particular, el uso reduce los niveles de HbA1C, en donde reducir los niveles de HbA1C es indicativo de una reducción duradera en los niveles de glucemia en el tiempo. Una variedad de indicadores ilustrativos se conocen en la técnica y se describen en la presente descripción que incluyen, sin limitarse a, una reducción de la glucosa, insulina, peso corporal, lípidos séricos (colesterol total, LDL, triglicéridos), enzimas hepáticas (ALT, AST), peso hepático, peso hepático relativo (% de peso corporal), puntuación de actividad de NAFLD (NAS), la puntuación de la fibrosis (por ejemplo, la fibrosis hepática), citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL1 β , MCP-1), biomarcadores de fibrosis (α SMA, Colágeno 1 alfa), colesterol hepático, triglicéridos hepáticos, y ácidos grasos hepáticos. Los aumentos en al menos la adiponectina de alto peso molecular (HMW) o las HDL son también indicadores de la eficacia clínica de los compuestos y las composiciones descritos en la presente descripción.

En otro aspecto, se presenta el uso de un conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción en la preparación de un medicamento para su uso en un método para tratar la diabetes o una enfermedad relacionada con la diabetes. La diabetes o la enfermedad relacionada con la diabetes pueden comprender al menos una entre la diabetes tipo 2, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), o el síndrome metabólico. En una modalidad particular, la diabetes o la enfermedad relacionada con la diabetes afectan a un sujeto humano. En una modalidad más particular, el uso reduce los niveles de HbA1C, en donde reducir los niveles de HbA1C es indicativo de una reducción duradera en los niveles de glucemia en el tiempo. Una variedad de indicadores ilustrativos se conocen en la técnica y se describen en la presente descripción que incluyen, sin limitarse a, una reducción de la glucosa, insulina, peso corporal, lípidos séricos (colesterol total, LDL, triglicéridos), enzimas hepáticas (ALT, AST), peso hepático, peso hepático relativo (% de peso corporal), puntuación de actividad de NAFLD (NAS), la puntuación de la fibrosis (por ejemplo, la fibrosis hepática), citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL1 β , MCP-1), biomarcadores de fibrosis (α SMA, Colágeno 1 alfa), colesterol hepático, triglicéridos hepáticos, y ácidos grasos hepáticos. Los aumentos en al menos la adiponectina de alto peso molecular (HMW) o las HDL son también indicadores de la eficacia clínica de los compuestos y las composiciones descritos en la presente descripción.

40 Breve descripción de las figuras

Figura 1: La estructura de un péptido de FGF-21 mutante como se propone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. n está en el intervalo seleccionado de 450 a 460.

Figura 2: Rendimiento aislado global después de la purificación y formulación del FGF-21 de tipo salvaje/nativo y los mutantes ilustrativos, dados en mg de proteína FGF-21 por litro de producto fermentado en un matraz de agitación.

Figura 3: Diagrama de flujo del proceso ilustrativo de expansión, producción y cosecha celular.

Figura 4: Diagrama de flujo del proceso ilustrativo de replegado y purificación del péptido del FGF-21 mutante.

Figura 5: Diagrama de flujo del proceso ilustrativo de Glucopegilación y purificación final.

Figura 6: SDS-PAGE no reductora de muestras de conjugado de PEG 20 kDa-FGF-21 mutante (P(172)TQGAS) almacenadas a (2-8) °C y 40 °C durante una semana. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: muestra de pH 5 almacenada a (2-8) °C, carril 3: muestra de pH 5 almacenada a 40 °C, carril 4: muestra de pH 6 almacenada a (2-8) °C, carril 5: muestra de pH 6 almacenada a 40 °C, carril 6: muestra de pH 7 almacenada a (2-8) °C, carril 7: muestra de pH 7 almacenada a 40 °C. Las composiciones de las muestras fueron las siguientes:

Muestra	Composición
muestra de 'pH 5'	2 mg/ml de gPEG-FGF21, acetato 20 mM, NaCl 125 mM, pH 5,0
muestra de 'pH 6'	2 mg/ml de gPEG-FGF21, histidina 20 mM, NaCl 125 mM, pH 6,0
muestra de 'pH 7'	2 mg/ml de gPEG-FGF21, fosfato 20 mM, NaCl 125 mM, pH 7,0

Como puede observarse en la imagen del gel, las muestras que tienen un pH de 7 contienen el menor número de agregados (bandas con un peso molecular mayor) y otros productos de degradación (bandas con un peso molecular menor) en comparación con las muestras que tienen un pH de 5 o 6.

Figura 7: Concentración de partículas subvisibles $\geq 10 \mu\text{m}$ en función de la concentración de polisorbato 20.

Figura 8: Efecto del conjugado del péptido de PEG 20 kDa-FGF-21 mutante (P (172)TQGAS) sobre la HbA1c en

monos cynomolgus diabéticos (cf. Ejemplo 12).

Figura 9: Efecto del conjugado del péptido de FGF-21 mutante en la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) (cf. Ejemplo 12). Los datos se muestran como el área bajo la curva (AUC) para cada tratamiento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 10: Efecto del conjugado del péptido de FGF-21 mutante sobre la concentración sérica de ALT en monos cynomolgus diabéticos.

Figura 11: Niveles de triglicéridos en monos cynomolgus diabéticos tratados con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante.

Figura 12: Niveles de colesterol HDL en monos cynomolgus diabéticos tratados con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante.

Figura 13: Niveles de adiponectina en monos cynomolgus diabéticos tratados con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante.

Figura 14: Puntuación de actividad de NAFLD en el modelo STAM después del tratamiento con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante (denominado en la presente descripción TEV-47948). NAS = Puntuación de actividad de NAFLD.

Figura 15A-D: El conjugado del péptido de FGF-21 mutante (denominado en la presente descripción TEV-47948) reduce significativamente la puntuación de actividad de NAFLD (NAS) en el modelo DIN (Modelo NASH inducido por dieta) como se refleja por una reducción de la esteatosis (A), la inflamación (B) y la fibrosis (C). La reducción en la puntuación total del NAS se muestra en (D).

Figura 16A-D: El conjugado del péptido de FGF-21 mutante (denominado en la presente descripción TEV-47948) reduce significativamente la expresión de citocinas proinflamatorias en el modelo DIN, como se refleja por una reducción en la interleucina 1 beta (IL1 β) (A), la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (B) y la actina alfa del músculo liso (α SMA) (C), y el colágeno 1 α 1 (D).

Figura 17: El conjugado del péptido de FGF-21 mutante (denominado en la presente descripción TEV-47948) reduce el peso corporal en el modelo DIN.

Figura 18A-C: El conjugado del péptido de FGF-21 mutante (denominado en la presente descripción TEV-47948) reduce significativamente los niveles de glucosa (A), la insulina plasmática (B) y la evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR) (C) en el modelo DIN.

Figura 19A-B: El conjugado del péptido de FGF-21 mutante (denominado en la presente descripción TEV-47948) reduce significativamente los niveles de colesterol total (A) y los triglicéridos totales (B) en el modelo DIN.

Figura 20A-C: El conjugado del péptido de FGF-21 mutante (denominado en la presente descripción TEV-47948) reduce significativamente los niveles de colesterol hepático (A), triglicéridos hepáticos (B) y ácidos grasos hepáticos (C) en el modelo DIN.

Entre los beneficios y mejoras que se han descrito, otros objetos y ventajas de esta invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción tomada junto con las figuras acompañantes. Las modalidades detalladas de la presente invención se describen en la presente descripción; sin embargo, debe entenderse que las modalidades descritas son meramente ilustrativas de la invención que puede llevarse a la práctica en diversas formas. Además, cada uno de los ejemplos dados en relación con las diversas modalidades de la invención pretenden ser ilustrativos, y no restrictivos.

Definiciones

En aras de la claridad y la legibilidad, se proporcionan las siguientes definiciones. Cualquier característica técnica mencionada para estas definiciones puede leerse en todas y cada una de las modalidades de la invención. Las definiciones y explicaciones adicionales pueden proporcionarse específicamente en el contexto de estas modalidades. A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción generalmente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura usada en la presente descripción y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos son los que se conocen bien y se emplean comúnmente en la técnica. Las técnicas estándar se usan para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (por ejemplo, Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), que se proporcionan a lo largo de este documento.

Enzima: Las enzimas son biomoléculas catalíticamente activas que realizan reacciones bioquímicas tales como la transferencia de fracciones de glucosilo o fracciones de glucosilo modificadas desde los respectivos donantes de glucosilo a un aminoácido de FGF-21 o a otra fracción de glucosilo unida al péptido.

Proteína: Una proteína típicamente comprende uno o más péptidos o polipéptidos. Una proteína se pliega típicamente en una forma tridimensional, que puede ser necesaria para que la proteína ejerza su función biológica. La secuencia de una proteína o péptido se entiende típicamente que está en el orden, es decir, la sucesión de sus aminoácidos.

Proteína recombinante: El término "proteína recombinante" se refiere a las proteínas producidas en un sistema heterólogo, es decir, en un organismo que no produce naturalmente tal proteína, o una variante de tal proteína, es

decir, la proteína o péptido se “produce de forma recombinante”. Típicamente, los sistemas heterólogos usados en la técnica para producir proteínas recombinantes son bacterias (por ejemplo, *Escherichia (E.) coli*), levadura (por ejemplo, *Saccharomyces (S.) cerevisiae*) o determinadas líneas de cultivo celular de mamíferos.

- 5 Huésped de expresión: Un huésped de expresión denota un organismo que se usa para la producción de proteínas recombinantes. Los huéspedes generales de expresión son bacterias, tal como *E. coli*, levaduras, tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, o también células de mamíferos, tales como células humanas.

- 10 ARN, ARNm: El ARN es la abreviatura habitual para el ácido ribonucleico. Es una molécula de ácido nucleico, es decir, un polímero que consiste de nucleótidos. Estos nucleótidos suelen ser monómeros de monofosfato de adenosina, monofosfato de uridina, monofosfato de guanosina y monofosfato de citidina que se conectan entre sí a lo largo de una llamada cadena principal. La cadena principal está formada por enlaces fosfodiéster entre el azúcar, es decir, la ribosa, de un primer monómero y una fracción de fosfato de un segundo monómero adyacente. La sucesión específica de los monómeros se llama secuencia de ARN.

- 15 ADN: El ADN es la abreviatura habitual del ácido desoxirribonucleico. Es una molécula de ácido nucleico, es decir, un polímero que consiste de monómeros de nucleótidos. Estos nucleótidos suelen ser monómeros de monofosfato de desoxiadenosina, monofosfato de desoxitimidina, monofosfato de desoxiguanosina y monofosfato de desoxicitidina, que están por sí mismos, compuestos por una fracción de azúcar (desoxirribosa), una fracción de base y una fracción de fosfato, y polimerizados por una estructura de la cadena principal característica. La estructura de la cadena principal está, típicamente, formada por enlaces fosfodiéster entre la fracción de azúcar del nucleótido, es decir, desoxirribosa, de un primer monómero y una fracción de fosfato de un segundo monómero adyacente. El orden específico de los monómeros, es decir, el orden de las bases unidas a la cadena principal de azúcar/fosfato, se llama secuencia de ADN. El ADN puede ser de simple o doble hebra. En la forma de doble hebra, los nucleótidos de la primera hebra típicamente se hibridan con los nucleótidos de la segunda hebra, por ejemplo, mediante el emparejamiento de base A/T y el emparejamiento de base G/C.

- 20 Secuencia de una molécula de ácido nucleico/secuencia de ácido nucleico: La secuencia de una molécula de ácido nucleico se entiende típicamente que está en el orden particular e individual, es decir, la sucesión de sus nucleótidos.

- 30 Secuencia de moléculas de aminoácidos/secuencia de aminoácidos: La secuencia de una proteína o péptido se entiende típicamente que está en el orden, es decir, la sucesión de sus aminoácidos.

- 35 Identidad de secuencia: Dos o más secuencias son idénticas si exhiben la misma longitud y orden de los nucleótidos o aminoácidos. El porcentaje de identidad describe típicamente la medida, en la que dos secuencias son idénticas, es decir, describe típicamente el porcentaje de nucleótidos que corresponden en su posición de secuencia a nucleótidos idénticos de una secuencia de referencia, tal como una secuencia nativa o de tipo salvaje. Para la determinación del grado de identidad, las secuencias a comparar se consideran que exhiben la misma longitud, es decir, la longitud de la secuencia más larga de las secuencias a comparar. Esto significa que una primera secuencia que consiste en 8 nucleótidos/aminoácidos es 80 % idéntica a una segunda secuencia que consiste en 10 nucleótidos/aminoácidos que comprenden la primera secuencia. En otras palabras, en el contexto de la presente invención, la identidad de las secuencias se refiere particularmente al porcentaje de nucleótidos/aminoácidos de una secuencia, que tienen la misma posición en dos o más secuencias que tienen la misma longitud. Las brechas suelen considerarse como posiciones no idénticas, independientemente de su posición real en un alineamiento.

- 40 Aminoácidos recién introducidos: Los “aminoácidos recién introducidos” denotan aminoácidos que se introducen recientemente en una secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos nativa/ de tipo salvaje. La secuencia de aminoácidos nativa se cambia, habitualmente por mutagénesis, para que tenga una determinada cadena lateral de aminoácidos en una posición deseada dentro de la secuencia de aminoácidos. En la presente invención, en particular, el aminoácido treonina recién se introduce en la secuencia de aminoácidos en el lado C-terminal adyacente a un residuo de prolina.

- 50 Grupo funcional: El término debe entenderse de acuerdo con la comprensión general del experto en la técnica y denota una fracción química que está presente en una molécula, en particular en el péptido o aminoácido del péptido o residuo de glucosilo que se une al péptido, y que puede participar en un enlace covalente o no covalente a otra molécula química, es decir, que permite, por ejemplo, la unión de un PEG o un residuo de glucosilo.

- 55 Secuencia de aminoácidos nativa: El término debe entenderse de acuerdo con la comprensión general del experto en la técnica y denota la secuencia de aminoácidos en la forma de su ocurrencia en la naturaleza sin ninguna mutación o modificación de aminoácidos por parte del hombre. También se llama “secuencia de tipo salvaje”. “FGF-21 nativo” o “FGF-21 de tipo salvaje” denota al FGF-21 que tiene la secuencia de aminoácidos como ocurre en la naturaleza, tal como la secuencia de aminoácidos (no mutada) del FGF-21 humano como se representa en la SEQ ID NO: 1. La presencia o ausencia de una metionina N-terminal, que depende del huésped de expresión usado, no suele cambiar el estado de una proteína que se considera que tiene su secuencia natural o nativa/de tipo salvaje.

Mutado(a): El término debe entenderse de acuerdo con la comprensión general del experto en la técnica. Una secuencia de aminoácidos se llama "mutada" si contiene al menos un aminoácido adicional, eliminado o intercambiado en su secuencia de aminoácidos en comparación con su secuencia de aminoácidos natural o nativa, es decir, si contiene una mutación de aminoácidos. Las proteínas mutadas también se llaman mutantes. En la presente invención, un péptido de FGF-21 mutado es particularmente un péptido que tiene un intercambio de aminoácidos adyacente a un residuo de prolina en el lado C-terminal del residuo de prolina. De esta manera se introduce una secuencia consenso para la O-glucosilación en el FGF-21 de manera que el péptido FGF-21 mutante comprende un sitio de O-glucosilación recién introducido. Los intercambios de aminoácidos se denotan típicamente de la siguiente manera: S¹⁷³T lo que significa que el aminoácido serina en la posición 173, tal como en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, se intercambia por el aminoácido treonina.

Cantidad farmacéuticamente efectiva: Una cantidad farmacéuticamente efectiva en el contexto de la invención se entiende típicamente que es una cantidad que es suficiente para inducir un efecto farmacéutico.

Terapia/tratamiento: El término "terapia" se refiere a "tratar" o al "tratamiento" de una enfermedad o afección, que inhibe la enfermedad (enlentecer o detener su desarrollo), proporciona alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluido el tratamiento paliativo) y alivia la enfermedad (que provoca la regresión de la enfermedad).

Cantidad terapéuticamente efectiva: es una cantidad de un compuesto que es suficiente para tratar una enfermedad o afección, inhibir la enfermedad o afección, proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad, y/o causar la regresión de la enfermedad o afección.

Semivida: El término "semivida", como se usa en la presente descripción en el contexto de administrar un péptido de FGF-21 mutante y/o conjugado del mismo, se define como el tiempo necesario para que la concentración plasmática de un fármaco, es decir, del péptido de FGF-21 mutante y/o conjugado, se reduzca a la mitad en un sujeto.

O-glucosilación: La "O-glucosilación" tiene lugar en residuos de serina o treonina (Tanner y otros, Biochim. Biophys. Acta. 906:81-91 (1987); y Hounsell y otros, Glycoconj. J. 13:19-26 (1996)). En la presente invención, los sitios de O-glucosilación, que son motivos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un péptido, reconocidos por las glucosiltransferasas como puntos de acoplamiento para residuos de glucosilo, incluyen el motivo de aminoácidos prolina-treonina (PT), que no está presente en la secuencia de aminoácidos nativa/de tipo salvaje. En particular, el residuo de treonina recién se introduce adyacente a una prolina y en el lado C-terminal de un residuo de prolina. La fracción de glucosilo se une entonces al grupo -OH del residuo de treonina por la glucosiltransferasa.

Sitio de O-glucosilación recién introducido: "Sitio de O-glucosilación recién introducido" denota un sitio de O-glucosilación que no existía en el FGF-21 nativo o de tipo salvaje antes de introducir una treonina adyacente al lado C-terminal y en el lado C-terminal de un residuo de prolina como se describe en la presente descripción.

Adyacente: Adyacente denota al aminoácido que está inmediatamente próximo a otro aminoácido en la secuencia de aminoácidos, ya sea en el lado N-terminal o C-terminal del aminoácido respectivo. En la presente invención, por ejemplo, el residuo de treonina recién introducido está adyacente al residuo de prolina en el lado C-terminal de un residuo de prolina.

Fracción de glucosilo: Una fracción de glucosilo es una fracción que consiste en uno o más residuos de glucosilo idénticos o diferentes que enlazan el péptido de FGF-21 mutante a un polietilenglicol (PEG), de esta manera se forma un conjugado que comprende un péptido, una fracción de glucosilo y el PEG. La fracción de glucosilo puede ser una fracción de mono, di, tri u oligoglucosilo. La fracción de glucosilo puede comprender uno o más residuos de ácido siálico, uno o más residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc), uno o más residuos de galactosa (Gal) y otros. La fracción de glucosilo puede modificarse, tal como con un PEG o metoxi-PEG (m-PEG), un derivado alquilo del PEG.

Glucosilación: "Glucosilación", como se usa en la presente descripción, se refiere a la conjugación mediada enzimáticamente de una fracción de glucosilo modificado con PEG a un aminoácido o residuo de glucosilo de un (poli)péptido, por ejemplo, un FGF-21 mutante de la presente invención. Un subgénero de la "glucosilación" es la "gluco-pegilación" en la que el grupo modificador de la fracción de glucosilo modificada es el PEG o el m-PEG. El PEG puede ser lineal o ramificado. Típicamente, un PEG ramificado tiene una fracción de núcleo central ramificado y una pluralidad de cadenas de polímero lineal enlazadas al núcleo central ramificado. El PEG se usa comúnmente en formas ramificadas que pueden prepararse mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como el glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La fracción central ramificada también puede derivarse de varios aminoácidos, tales como la lisina. El PEG ramificado puede representarse en forma general como R(-PEG-OX)_m en el que R representa la fracción del núcleo, tal como el glicerol o el pentaeritritol, X representa un grupo de bloqueo o un grupo de extremo, y m representa el número de brazos. Los términos "gluco-PEG" y "glucosil-PEG" se usan indistintamente y denotan una fracción química que consiste de PEG o metoxi-PEG (mPEG o m-PEG), uno o más residuos de glucosilo (o fracciones de glucosilo), y opcionalmente un enlazador entre el PEG/metoxi-PEG y las fracciones de glucosilo, tales como un aminoácido, por ejemplo, la glicina. Un ejemplo de una fracción de glucosil-PEG/glucosil-PEG

es el PEG-ácido siálico (PEG-Sia). Se debe señalar que los términos "gluco-PEG" y "glucosil-PEG", así como también "PEG-ácido siálico" y "PEG-Sia", así como también los términos similares para las fracciones de gluco-PEG pueden incluir o no un enlazador entre el PEG y la fracción o fracciones de glucosilo, es decir, "PEG-ácido siálico" abarca, por ejemplo, el PEG-ácido siálico, así como también el PEG-Gly-ácido siálico, así como también el mPEG-Gly-ácido siálico.

Motivo de secuencia: Un motivo de secuencia denota una secuencia de aminoácidos corta, tal como la que comprende solo dos aminoácidos, que está presente en cualquier posición posible en una secuencia de aminoácidos más larga, tal como en la secuencia de aminoácidos del FGF-21 humano. Los motivos de secuencia se denotan, por ejemplo, como P¹⁷²T, lo que significa que a la prolina en la posición 172 le sigue inmediatamente en el lado C-terminal un residuo de treonina.

Ácido siálico: El término "ácido siálico" o "Sia" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-nonulopiranos-1-ónico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glucolilneuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetil del NeuAc se hidroxila. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano y otros (1986) J. Biol. Chem. 261:11550-11557). También se incluyen ácidos siálicos sustituidos en el Carbono 9 tales como un 9-O-C₁-C₆ acil-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para la revisión de la familia del ácido siálico, véase, por ejemplo, Varki, Glycobiology 2:25-40 (1992)).

Excipiente farmacéuticamente aceptable: El excipiente "farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material, que cuando se combina con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante de la invención conserva la actividad de los conjugados y no es reactivo con el sistema inmunitario de un sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los excipientes farmacéuticos estándar tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, sales, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes.

Contenedor farmacéutico: Un "contenedor farmacéutico" es un contenedor que es adecuado para llevar una composición farmacéutica y que típicamente se hace de un material inerte y es estéril.

Administrar: El término "administrar" significa administración oral, inhalación, administración como un supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o subcutánea, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una bomba miniosmótica, al sujeto. La administración se realiza por cualquier vía, que incluye la parenteral y la transmucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Otros modos de suministro incluyen, pero no se limitan a, el uso de formulaciones de liposomas, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

Diabetes y enfermedades relacionadas con la diabetes: "Diabetes" es una enfermedad bien conocida y bien caracterizada a menudo denominada diabetes mellitus. El término describe un grupo de enfermedades metabólicas en las que la persona tiene niveles altos de glucemia (azúcar en sangre), ya sea porque la producción de insulina es inadecuada o porque las células del cuerpo no responden bien a la insulina, o ambas. Los pacientes con niveles altos de glucemia típicamente experimentarán poliuria (orina frecuente), se sentirán cada vez más sedientos (polidipsia) y hambrientos (polifagia). Las "enfermedades relacionadas con la diabetes" son enfermedades caracterizadas por los mismos síntomas, tales como la obesidad, la poliuria, la polidipsia y la polifagia.

Diabetes tipo 2: "Diabetes tipo 2" es la forma más común de diabetes/diabetes mellitus. La diabetes tipo 2 se desarrolla más comúnmente en la edad adulta y es más probable que ocurra en personas con sobrepeso e inactivas físicamente. A diferencia de la diabetes tipo 1, que actualmente no puede prevenirse, muchos de los factores de riesgo de la diabetes tipo 2 pueden modificarse. La Fundación Internacional para la Diabetes enumera cuatro síntomas que indican la necesidad de hacer una prueba de diabetes: a) micción frecuente, b) pérdida de peso, c) falta de energía y d) sed excesiva. La resistencia a la insulina suele ser el precursor de la diabetes tipo 2, una afección en la que se necesita más insulina de lo habitual para que la glucosa entre en las células. La resistencia a la insulina en el hígado resulta en una mayor producción de glucosa, mientras que la resistencia en los tejidos periféricos significa que la captación de glucosa se ve afectada.

Esteatohepatitis no alcohólica (NASH): una afección en la que se deposita grasa en el hígado con el subsecuente daño e inflamación del hígado.

Síndrome metabólico: un conglomerado definido de factores de riesgo (cambios bioquímicos y fisiológicos) que se asocian con el desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

Descripción detallada de la invención

Se ha demostrado que el FGF-21 recombinante influye en los niveles de glucosa e insulina plasmática, reduce los

niveles de triglicéridos y colesterol hepáticos y circulantes, y mejora la sensibilidad a la insulina, el gasto energético, la esteatosis hepática y la obesidad en un intervalo de modelos animales resistentes a la insulina. Por esta razón, el FGF-21 es una diana interesante para el tratamiento de la diabetes tipo 2 humana, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y las enfermedades metabólicas asociadas.

El FGF-21 natural tiene una semivida comparativamente corta *in vivo*, con una semivida circulante notificada que varía de 0,5 a 4 horas en roedores y primates no humanos, lo que limita su aplicabilidad clínica. La semivida del FGF-21 recombinante humano es de 1-2 horas. Para mejorar las propiedades farmacocinéticas del FGF-21, se han desarrollado diversas estrategias de extensión de la semivida.

Las abreviaturas usadas en la presente descripción incluyen: PEG, poli(etilenglicol); PPG, poli(propilenglicol); Ara, arabinosilo; Fru, fructosilo; Fuc, fucosilo; Gal, galactosilo; GalNAc, N-acetilgalactosaminilo; Glc, glucosilo; GlcNAc, N-acetilglucosaminilo; Man, manosilo; ManAc, manosaminilo acetato; Xil, xilosilo; NeuAc, sialil o N-acetilneuraminilo; Sia, sialilo o N-acetilneuraminilo; y derivados y análogos de los mismos.

Pegilación

Un método para prolongar la semivida de una proteína es la unión de uno o más fracciones de PEG a la proteína, cuya unión aumenta la estabilidad y solubilidad biofísica de la proteína en general. Se ha probado que este enfoque tiene un valor particular con respecto al aumento de la semivida terapéutica de las proteínas que tienen propiedades adecuadas para tratar a los sujetos que lo necesitan. Sin embargo, el FGF-21 nativo carece de un sitio de pegilación de proteínas específico. La pegilación química sin un sitio de pegilación de proteínas específico, no es sitio-específica y típicamente resulta en la generación de una población de productos no homogéneos que requieren una purificación exhaustiva para lograr un producto homogéneo y de alta pureza, un requisito previo para la aprobación del mercado como composición farmacéutica. En consecuencia, la pegilación sitio-específica del FGF-21 es conveniente para generar péptidos pegilados sitio-específicos del FGF-21 que tengan una semivida mejorada y una buena actividad biológica.

Las síntesis en base a enzimas tienen las ventajas de la regioselectividad y la estereoselectividad. Además, las síntesis enzimáticas pueden realizarse con sustratos desprotegidos. Un posible método para unir los residuos de PEG, de manera sitio-específica, a una proteína, es la glucopegilación. En la glucopegilación, una fracción de PEG puede transferirse a un aminoácido o residuo de glucosilo unido a un aminoácido de la proteína o péptido mediante el uso de una glucosiltransferasa. La estructura final general es la proteína - fracción de glucosilo - enlazador adicional opcional - PEG. Una estructura final más particular es la proteína - aminoácido (N-, C- o interno) de la proteína - uno o más residuos de glucosilo - enlazador opcional (por ejemplo, enlazador de aminoácidos) - fracción de PEG lineal o ramificado de diversas longitudes, en donde la fracción de glucosilo puede comprender uno o más residuos de glucosilo. El uno o más residuos de glucosilo que comprenden al menos una parte de la estructura que enlaza la proteína a la fracción de PEG puede ser cualquier posible residuo de glucosilo. Una serie diversa de métodos para las proteínas glucopegilantes se conocen en la técnica y se describen en detalle en la presente descripción más abajo.

En la pegilación de proteínas, cuanto más grande sea la fracción de PEG conjugada, más larga será la semivida esperada de una proteína conjugada con PEG. Esto se debe a la capacidad relativamente potenciada de las fracciones de PEG más grandes para proteger las proteínas conjugadas de las proteasas presentes en la circulación sanguínea. Las fracciones de PEG grandes confieren un radio efectivo más grande a una proteína conjugada con PEG que las fracciones de PEG más pequeñas. Las proteínas más grandes también se degradan y se eliminan de la circulación sanguínea más lentamente que las proteínas más pequeñas, porque entran en el riñón más lentamente o se evita que entren por completo en el riñón. En consecuencia, los expertos favorecen los procesos de pegilación que requieren unir un residuo de PEG más largo de un peso molecular mayor (por ejemplo, PEG $\geq$ 30 kDa), un mayor número de residuos de PEG en total, y/o más residuos de PEG muy ramificados a una proteína para crear una proteína pegilada que tiene propiedades superiores con relación a la misma proteína conjugada a una fracción de PEG más corta/pequeña.

Una desventaja considerable asociada con la pegilación es, sin embargo, los posibles obstáculos estéricos, de manera que una fracción de PEG conjugada podría bloquear físicamente un sitio activo de la proteína que es importante o esencial para la actividad de la proteína. Por ejemplo, una fracción de PEG puede bloquear específicamente un sitio de unión al receptor de una proteína para su receptor, lo que, a su vez, conduce a una pérdida significativa y perjudicial de la actividad de la proteína. Para evitar tales posibles efectos inhibidores de la pegilación, los expertos en la técnica evitan la unión del PEG cerca de aminoácidos implicados en la unión al receptor.

Con respecto al FGF-21, el extremo C-terminal es crítico para la unión a β -Klotho y el extremo N-terminal es importante para la activación del FGFR. Además, el modelado *in silico* de FGF-21 en base a las estructuras cristalinas de otras proteínas de la familia FGF-21 y ensayos de potencia *in vitro* demostraron que la pegilación de los residuos de aminoácidos ubicados en los dominios de unión al supuesto receptor eran inactivos, mientras que la pegilación en sitios distales produjo los análogos más activos. Además, se observó una pérdida de potencia superior

a 100 veces en un ensayo de potencia basado en células, cuando se colocó una fracción de PEG en la posición 180 del FGF-21. La fusión del FGF-21 a la porción Fc de un anticuerpo también se examinó, y la fusión en el extremo C-terminal del FGF-21 produjo un análogo mucho más débil que la fusión en el extremo N-terminal. Por el contrario, se ha generado el FGF-21 pegilado en el extremo N-terminal y se ha demostrado que es biológicamente activo. En base al conocimiento en el campo, por lo tanto, un experto evitaría la pegilación cerca del extremo C-terminal del FGF-21, a la luz del papel que esta región de la proteína juega en la unión y la señalización.

Frente a este escenario, los presentes inventores se propusieron generar una pluralidad de conjugados de péptidos mutantes del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21 (FGF-21), cada uno de los cuales comprende

- i) un péptido de FGF-21 mutante que comprende al menos un residuo de treonina (T) adyacente a al menos un residuo de prolina (P) en el lado C-terminal de dicho al menos un residuo de prolina, de esta manera se forma al menos un sitio de O-glucosilación que no existe en el FGF-21 nativo correspondiente, en donde el FGF-21 nativo correspondiente tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, y
- ii) un polietilenglicol (PEG) de 20 kDa, en donde dicho PEG de 20 kDa se une covalentemente a dicho péptido de FGF-21 mutante en dicho al menos un residuo de treonina a través de al menos una fracción de glucosilo.

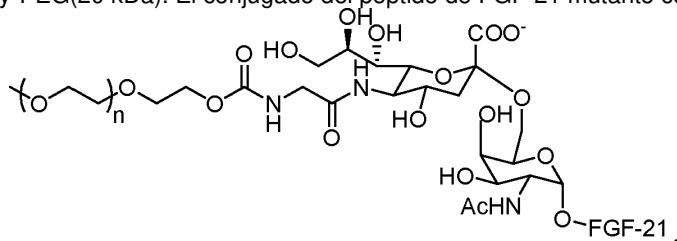
El conjugado del péptido de FGF-21 mutante comprende un péptido de FGF-21 mutante que comprende la secuencia de aminoácidos PT, en donde las posiciones de la prolina y la treonina se basan en la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 1.

En otra modalidad particular, el péptido de FGF-21 mutante comprende la secuencia de aminoácidos P172T, en donde las posiciones de la prolina y la treonina se basan en la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 1.

El péptido de FGF-21 mutante comprende las mutaciones S173T y R176A, en donde las posiciones de los aminoácidos S y R se basan en la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 1, y el péptido de FGF-21 mutante comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 2.

En una modalidad particular de la misma, al menos una fracción de glucosilo comprende la estructura -GalNAc-Sia-.

En otras modalidades particulares, el conjugado del péptido de FGF-21 mutante comprende una fracción de PEG de 20 kDa que se une a al menos a una fracción de glucosilo a través de un residuo de aminoácido, particularmente la glicina (Gly). En una modalidad incluso más particular, el conjugado del péptido de FGF-21 mutante comprende la estructura -GalNAc-Sia-Gly-PEG(20 kDa). El conjugado del péptido de FGF-21 mutante comprende la estructura:



en donde n es un número entero seleccionado de 450 a 460.

También se abarca en la presente descripción una composición farmacéutica que comprende al menos un conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad particular, el conjugado del péptido de FGF-21 mutante está presente en una concentración en el intervalo de 0,1 mg/ml a 50 mg/ml, particularmente de 1 mg/ml a 45 mg/ml, más particularmente de 10 mg/ml a 40 mg/ml, muy particularmente en una concentración de 26 ± 4 mg/ml. El agente tampón puede ser un tampón Tris. El agente tampón puede presentarse en una concentración de 1 mM a 100 mM, particularmente de 2 mM a 75 mM, más particularmente de 5 mM a 50 mM, incluso más particularmente de 10 mM a 25 mM, muy particularmente de 16 ± 2 mM. El pH puede estar en el intervalo de 6,0 a 8,5, particularmente de 6,5 a 8,0, más particularmente de 6,75 a 8,0, y muy particularmente es $7,5 \pm 0,3$. La composición farmacéutica puede comprender además una sal, particularmente una sal inorgánica, más particularmente NaCl. La composición farmacéutica puede comprender una sal que está presente en una concentración de 30 mM a 200 mM, particularmente de 40 mM a 150 mM, más particularmente de 50 mM a 100 mM, muy particularmente de 56 ± 2 mM. La composición farmacéutica puede comprender además un agente modificador de la tonicidad. Los agentes modificadores de la tonicidad adecuados incluyen glicerol, aminoácidos, cloruro de sodio, proteínas, azúcares y alcoholes de azúcar, particularmente el agente modificador de la tonicidad es un azúcar, y más particularmente el agente modificador de la tonicidad es la sacarosa. El agente modificador de la tonicidad está presente en una concentración de 50 mM a 200 mM, más particularmente en una concentración de 100 mM a 175 mM, incluso más particularmente está presente en una concentración de 135 mM a 160 mM, y muy particularmente en una concentración de 150 ± 2 mM. La composición farmacéutica puede comprender además un surfactante, particularmente un surfactante no iónico. El

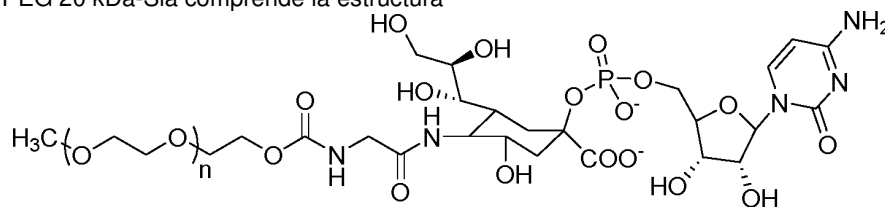
surfactante o surfactante no iónico puede ser un surfactante no iónico a base de polisorbato, particularmente polisorbato 20 o polisorbato 80, y más particularmente polisorbato 20. El surfactante o surfactante no iónico puede estar presente en una concentración de 0,01 mg/ml a 1 mg/ml, particularmente en una concentración de 0,05 a 0,5 mg/ml y más particularmente en una concentración de $0,2 \pm 0,02$ mg/ml.

En una modalidad particular, la composición farmacéutica comprende 0,1 mg/ml a 50 mg/ml del conjugado del péptido de FGF-21 mutante, agente tampón de 1 mM a 100 mM, particularmente tampón Tris, sal de 30 mM a 200 mM, particularmente NaCl, agente modificador de la tonicidad de 50 mM a 200 mM, particularmente sacarosa, y surfactante o surfactante no iónico de 0,01 mg/ml a 1 mg/ml, particularmente polisorbato 20, y tiene un pH de 6,0 a 8,5.

También se abarca en la presente descripción un contenedor farmacéutico que comprende al menos uno de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante descritos en la presente descripción y/o una composición farmacéutica que comprende los mismos. Los contenedores farmacéuticos adecuados incluyen, sin limitarse a, una jeringa, un vial, una botella de infusión, una ampolla, un carpule, una jeringa equipada con un sistema de protección de la aguja, y un carpule dentro de una pluma de inyección.

También se abarca en la presente descripción un método para producir el conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción, que comprende las etapas de:

- (1) producir de forma recombinante el péptido de FGF-21 mutante en un huésped de expresión; y
- (2) unir enzimáticamente al péptido de FGF-21 mutante de la etapa (1) una fracción de PEG-glucosilo, en donde el PEG tiene 20 kDa, de esta manera se forma el conjugado del péptido de FGF-21 mutante. En una modalidad particular, el huésped de expresión es *Escherichia coli*. En una modalidad más particular, la etapa (2) comprende una etapa (2a) de poner en contacto el péptido de FGF-21 mutante con un donante de GalNAc y una GalNAc transferasa en condiciones adecuadas para transferir GalNAc del donante de GalNAc a al menos un residuo de treonina del péptido de FGF-21 mutante. En una modalidad aún más particular, el donante de GalNAc es UDP-GalNAc. En otra modalidad particular, la GalNAc transferasa es la MBP-GalNAcT2. En otra modalidad particular, la etapa (2) comprende además una etapa (2b) de poner en contacto el producto de la etapa (2a), con un donante de PEG 20 kDa-Sia y una sialiltransferasa en condiciones adecuadas para transferir el PEG 20 kDa-Sia del donante de PEG 20 kDa-Sia a la GalNAc en el péptido de FGF-21 mutante. En una modalidad más particular, el donante de PEG 20 kDa-Sia es el PEG 20 kDa-Sia-CMP. En una modalidad aún más particular, la sialiltransferasa es la ST6GalNAc1. En una modalidad adicional aún más particular, el donante de PEG 20 kDa-Sia comprende la estructura



en donde n es un número entero seleccionado de 450 a 460.

En otra modalidad particular, el método comprende además una etapa (3), después de la etapa (1) y antes de la etapa (2), de purificar el péptido de FGF-21 mutante después de la producción recombinante. En una modalidad más particular, el método comprende además una etapa (4), después de la etapa (2), de purificar el conjugado del péptido de FGF-21 mutante formado en la etapa (2). En otra modalidad particular, el método, en donde la etapa (3) comprende someter el péptido de FGF-21 mutante, y/o la etapa (4) comprende someter el conjugado del péptido de FGF-21 mutante, el método puede comprender la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, filtración y sus combinaciones. Más particularmente, en donde la etapa de purificación comprende una o más etapas de la cromatografía de intercambio iónico, comprende particularmente dos etapas de la cromatografía de intercambio iónico. En otra modalidad particular, en donde la cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio aniónico, es más particularmente una cromatografía de intercambio aniónico fuerte. Más particularmente, en donde la cromatografía de intercambio aniónico emplea un miembro, este se selecciona del grupo que consiste en una matriz base de éter polivinílico hidrófilo, matriz polimérica de poliestireno/divinilbenceno, trimetilamonioetil (TEAE), dietilaminoetanol (DEAE), agarosa, una cromatografía de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario (Q) y sus combinaciones. En otra modalidad particular, en donde en la etapa (3) se realizan dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico, tales etapas usan una matriz base de éter polivinílico hidrófilo. Aún más particularmente, en donde en la etapa (4) se realizan etapas de cromatografía de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario (Q), se realizan dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario (Q). Más particularmente, en donde la arginina se añade en la etapa (2) y/o, si está presente, en la etapa (3), es particularmente al menos 400 mM de arginina. En una modalidad más particular, el método puede comprender además una etapa (5), después de la etapa (3) y antes de la etapa (2), de eliminación de endotoxinas, en donde el producto de la etapa (3) se filtra mediante el uso de un filtro de eliminación de endotoxinas.

En un aspecto adicional, se abarca un conjugado del péptido de FGF-21 mutante que puede obtenerse mediante los métodos anteriores, al igual que las composiciones farmacéuticas del mismo que comprenden además un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, un conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción o una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante descritos en la presente descripción para su uso en un método para tratar la diabetes y enfermedades relacionadas, particularmente se presenta la diabetes tipo 2, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y/o el síndrome metabólico, el método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción o una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante descritos en la presente descripción. En una modalidad particular, el sujeto que lo necesita es un sujeto humano.

Métodos para la glucosilación y la glucoconjugación de los péptidos de FGF-21

La modificación posterior a la expresión in vitro de péptidos y proteínas se usa comúnmente para producir glucopéptidos y glucoproteínas. Se dispone de una serie diversa de enzimas que transfieren fracciones donantes de sacáridos, de esta manera se hace posible la síntesis enzimática in vitro de glucoconjugados con patrones de glucosilación diseñados a medida y estructuras de glucosilo. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,876,980; 6,030,815; 5,728,554; 5,922,577; y solicitudes de patente publicadas WO 98/31826; WO 01/88117; WO 03/031464; WO 03/046150; WO 03/045980; WO 03/093448; WO 04/009838; WO 05/089102; WO 06/050247; WO 12/016984; US2002/142370; US2003/040037; US2003/180835; US2004/063911; US2003/207406; y US2003/124645.

Los grupos de enlace de glucosilo pueden unirse a un aminoácido ya sea a través de la cadena lateral o a través de la cadena principal del péptido. Alternativamente, los grupos de enlace de glucosilo pueden unirse al péptido a través de una fracción sacarilo, cuya fracción puede ser una porción de una estructura de glucanos enlazada a O o enlazada a N en el péptido.

De acuerdo con lo anterior, los presentes inventores se propusieron hacer conjugados del FGF-21 mutante glucosilado, que tienen sitios de glucosilación que no existen en la secuencia del FGF-21 de tipo salvaje correspondiente. Tales conjugados se formaron mediante la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido de FGF-21 glucosilado. El azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido y el grupo modificador en el azúcar puede denominarse en la presente descripción como "un grupo de enlace de glucosilo". Aprovechando la exquisita selectividad de las enzimas, tales como las glucosiltransferasas, los presentes inventores generaron péptidos de FGF-21 mutantes que tienen un grupo deseado en una o más ubicaciones específicas. Más particularmente, los presentes inventores usaron glucosiltransferasas para unir azúcares modificados a las fracciones de carbohidratos en los glucopéptidos de FGF-21 mutantes.

Conjugados de FGF-21

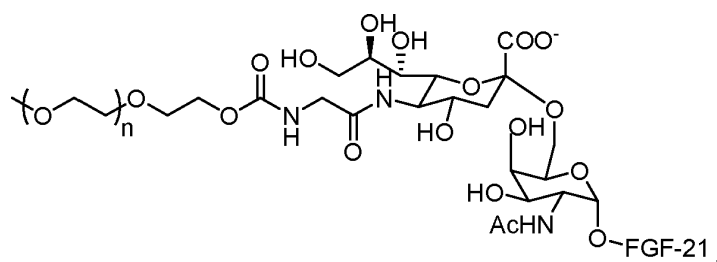
En otro aspecto, se presentan conjugados ilustrativos de un azúcar modificado y un péptido de FGF-21 mutante. Véase, por ejemplo, los Ejemplos 1-7 de la presente descripción más abajo. Más particularmente, los conjugados del péptido de FGF-21 se hicieron de manera que comprenden un péptido de FGF mutante y al menos un azúcar modificado, en donde un primer de al menos uno de los azúcares modificados se enlaza a un aminoácido del péptido a través de un grupo de enlace de glucosilo. Como se describe en la presente descripción, el aminoácido al que se une el grupo de enlace de glucosilo se muta para crear un sitio reconocido por la glucosiltransferasa.

En otra modalidad ilustrativa, un conjugado del péptido de FGF-21 mutante puede comprender un péptido de FGF-21 mutante y un grupo de glucosilo unido al residuo de aminoácido mutado del péptido de FGF-21 mutante.

En una modalidad aún más ilustrativa adicional, un péptido de FGF-21 mutante se pega de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. En una modalidad particular, el péptido de FGF-21 mutante comprende las mutaciones S¹⁷³T y R¹⁷⁶A, en donde las posiciones de los aminoácidos S y R se basan en la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 1. El péptido de FGF-21 mutante comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 2.

La fracción de PEG de 20 kDa se une al enlazador de glucosilo a través de un enlazador que es la glicina (Gly). Por ende, el PEG se une al aminoácido y el aminoácido se une a una fracción de glucosilo como se propone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. La fracción de glucosilo se une al enlazador de aminoácidos y al residuo de treonina recién introducido en la secuencia de aminoácidos del FGF-21 mutante. El residuo de aminoácido se une al PEG y al residuo de glucosilo mediante un método descrito en el documento WO 03/031464.

El conjugado del péptido de FGF-21 mutante comprende la estructura:



en donde n es un número entero seleccionado de 450 a 460 como también se representa en la Figura 1.

El PEG de 20 kDa puede ser lineal o ramificado, más particularmente el PEG de 20 kDa, es un PEG lineal de 20 kDa. Además, el PEG de 20 kDa es particularmente un metoxi-PEG de 20 kDa (mPEG, m-PEG). El PEG y el mPEG de diferente peso molecular pueden obtenerse a partir de diversos proveedores, tales como JenKem Technology Estados Unidos, Plano, TX, Estados Unidos, o Merckle Biotec, Ulm, Alemania. Se entiende en la técnica que PEG de 20kDa significa que el tamaño de los residuos de PEG es de 20 kDa en promedio y que la mayoría de los residuos de PEG son de 20 kDa de tamaño.

Péptidos de FGF-21 mutantes y conjugados de los mismos

Como se describe en la presente descripción, los presentes inventores han hecho variantes del Factor de Crecimiento de Fibroblastos-21 (FGF-21) que tienen propiedades sorprendentes, que incluyen variantes que tienen semividas excepcionalmente largas, cuyas variantes son conjugados de péptidos como se propone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Para la unión del residuo de PEG de 20 kDa, se introduce un residuo de treonina en la secuencia de aminoácidos del FGF-21 nativo adyacente a, y en el lado C-terminal de un residuo de prolina que ya está presente en la secuencia de aminoácidos del FGF-21 nativo, es decir, es un residuo de prolina nativo. Para este propósito, puede introducirse ya sea (i) una treonina adicional inmediatamente próxima al residuo de prolina nativo o (ii) el aminoácido nativo que está presente en la secuencia de aminoácidos nativa de FGF-21, adyacente y ubicado en el lado C-terminal de un residuo de prolina nativo, se intercambia por un residuo de treonina. En la presente invención, la opción (ii) es una modalidad ilustrativa. Como se describe en la presente descripción, más de un residuo de treonina puede introducirse adyacente y C-terminal a un residuo de prolina que ya está presente.

Mediante la introducción de un nuevo residuo de treonina en el lado C-terminal y adyacente a un residuo de prolina, se forma una secuencia consenso para la enzima de O-glucosilación. Debido a que los residuos de prolina se encuentran típicamente en la superficie de las proteínas (en, por ejemplo, vueltas, torceduras, y/o bucles), un diseño que requiere la O-glucosilación y pegilación de estas mediante el uso de una fracción de PEG-glucosilo en la proximidad cercana a un residuo de prolina, se beneficia de la accesibilidad relativa del sitio de unión diana para la glucosiltransferasa que transfiere la fracción de glucosilo o glucol-PEG y la posibilidad para acomodar la estructura de glucosilo y/o PEG conjugado sin interrumpir la estructura de la proteína.

Para la introducción de los residuos de treonina en la secuencia de aminoácidos nativa de FGF-21, se usan técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3.a ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Ausubel y otros, eds., Current Protocols in Molecular Biology (1994).

La secuencia de aminoácidos del FGF-21 nativo corresponde a la secuencia de aminoácidos nativos el FGF-21 humano que se representa en la SEQ ID NO: 1.

El péptido de FGF-21 mutante comprende la secuencia de aminoácidos PT, es decir, un residuo de treonina adyacente en el lado C-terminal a un residuo de prolina. La secuencia PT no está presente en la secuencia de aminoácidos del FGF-21 nativo.

El péptido de FGF-21 mutante comprende el motivo de secuencia P¹⁷²T, en base a la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 1, en donde las posiciones de la prolina y la treonina se basan en la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 1. Como se demostró por los resultados presentados en la presente descripción, el extremo C-terminal del FGF-21 tolera sorprendentemente la unión del PEG y en particular de las fracciones de glucosilo-PEG. Esto fue inesperado ya que la literatura informa que el extremo C-terminal intacto es necesario para la unión del FGF-21 al β -Klotho.

En una modalidad particular, el péptido de FGF-21 mutante comprende las mutaciones S¹⁷³T y R¹⁷⁶A, en donde las posiciones de los aminoácidos S y R se basan en la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 1, particularmente el péptido de FGF-21 mutante comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 2. Se ha encontrado que la mutación R¹⁷⁶A es beneficiosa para la estabilidad general de la

proteína después de introducir el sitio de O-glucosilación en la treonina 173. Mediante esta mutación, la cadena lateral de arginina relativamente grande se eliminó y se reemplazó por la cadena lateral pequeña de alanina. Se supone que la cadena lateral más pequeña de alanina interfiere menos con la fracción de glucosilo-PEG voluminosa que se une al péptido de FGF-21 mutado.

Se proporciona además una composición farmacéutica que comprende el conjugado del péptido de FGF-21 mutante y un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua o un tampón fisiológicamente compatible. La composición farmacéutica comprende típicamente una cantidad terapéuticamente efectiva o farmacéuticamente activa del conjugado del péptido de FGF-21 mutante como agente activo.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17.a ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos de suministro de fármacos, véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990). Se pretende que las composiciones farmacéuticas sean para la administración parenteral, intranasal, tópica, oral o local, tal como mediante inyección subcutánea, inhalación de aerosol o adsorción transdérmica, para su uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Comúnmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea o intravenosa. Por tanto, la invención proporciona composiciones para su uso en la administración parenteral que comprenden el conjugado del péptido de FGF-21 mutante disuelto o suspendido en un portador aceptable, particularmente un portador acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y similares. Las composiciones también pueden contener detergentes tales como Tween 20 y Tween 80; estabilizadores tales como manitol, sorbitol, sacarosa, y trehalosa; y conservantes tales como EDTA y m-cresol. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tampón y de ajuste de pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse por filtración. Las soluciones acuosas resultantes pueden empaquetarse para su uso tal cual, o liofilizadas, y la preparación liofilizada se combina con un portador acuoso estéril antes de la administración. Las composiciones que contienen los conjugados del péptido de FGF pueden usarse en la administración para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos, en particular para su uso en el tratamiento de la diabetes o enfermedades relacionadas con la diabetes, particularmente para el tratamiento de la diabetes tipo 2, NASH y el síndrome metabólico. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones deben administrarse a un sujeto que ya padece una enfermedad o afección relacionada con la diabetes, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "cantidad terapéuticamente efectiva" y suele depender del estado de salud y el peso del paciente. Las dosis eficaces varían de 0,1 mg/kg a 6 mg/kg cuando se prueban en diversos modelos animales de NASH y diabetes tipo 2.

La presente invención proporciona un conjugado del péptido de FGF-21 mutante o una composición farmacéutica que comprende el mismo para su uso en los métodos para tratar una enfermedad y/o un

BIL-P2764EP Amended description for OA3 Nov 21

trastorno o los síntomas del mismo, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto (un conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción) o una composición farmacéutica que comprende el mismo a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un humano). Por tanto, una modalidad es el compuesto o la composición para su uso para tratar a un sujeto que padece diabetes o una enfermedad relacionada con la diabetes (por ejemplo, la diabetes tipo 2, la NASH o el síndrome metabólico) o un síntoma de la misma. Se pretende que, para su uso, la composición se administre en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o trastorno o síntoma de la misma

Pueden llevarse a cabo administraciones únicas o múltiples de las composiciones, con niveles y patrones de dosis seleccionados por el médico responsable del paciente. En cualquier caso, las composiciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad del conjugado del péptido de FGF-21 mutante de esta invención suficiente para un tratamiento efectivo del sujeto que necesita tal tratamiento.

En la composición farmacéutica, el conjugado del péptido de FGF-21 mutante se presenta típicamente en una concentración en el intervalo de 0,1 mg/ml a 50 mg/ml, particularmente de 1 mg/ml a 45 mg/ml, más particularmente de 10 mg/ml a 40 mg/ml, muy particularmente en una concentración de 26 ± 4 mg/ml. En una modalidad más particular, la concentración del conjugado del péptido de FGF-21 mutante en una composición farmacéutica es de 33 ± 7 mg/ml o incluso más particularmente 26 ± 4 mg/ml.

Todos los componentes de la composición farmacéutica, así como también las concentraciones específicas de los componentes se han seleccionado cuidadosamente después de probar muchas condiciones, compuestos y concentraciones diferentes de los mismos. Por ende, la composición farmacéutica descrita en la presente

descripción no es una selección arbitraria de compuestos y concentraciones de compuestos sino una selección específica y racional de condiciones que se ha encontrado que son las más óptimas para una composición farmacéutica acuosa que contiene el conjugado del péptido de FGF-21 mutante o péptido de FGF-21 mutante de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

Además, la composición farmacéutica comprende particularmente un agente tampón, particularmente un tampón fosfato o Tris, más particularmente un tampón Tris, por ejemplo, Tris(hidroximetil)aminometano (THAM). Opcionalmente, el agente tampón está presente en una concentración de 1 mM a 100 mM, particularmente de 2 mM a 75 mM, más particularmente de 5 mM a 50 mM, incluso más particularmente de 10 mM a 25 mM, muy particularmente de 16 ± 2 mM. Se seleccionó el tampón Tris ya que se encontró que la solubilidad de la proteína es mejor que para otros sistemas de tampón y es adecuado mantener el pH a pH 7,5. Este pH parece el más óptimo para el almacenamiento prolongado del conjugado del péptido de FGF-21 mutante pegilado. Además, la probabilidad de cristalización del Tris a temperaturas más bajas es menor que la de los agentes tampón basados en fosfato.

El inventor encontró que el conjugado del péptido de FGF-21 mutante puede precipitar si el pH está por debajo de 6,0. Opcionalmente, el pH de la composición farmacéutica está en el intervalo de 6,0 a 8,5, particularmente de 6,5 a 8,0, más particularmente de 6,75 a 8,0, incluso más particularmente de 7,0 a 8,0, y muy particularmente es $7,5 \pm 0,3$, ya que la fragmentación más baja en SDS-PAGE y la menor agregación en la SEC se observó si el pH está en el intervalo de 7 - 8. Este pH también se ha identificado como opcional con respecto a la viscosidad. Como el pH de una solución puede depender de la temperatura de la solución, el pH debe adaptarse y medirse particularmente a 25 ± 2 °C. El pH se ajusta con HCl. La composición farmacéutica puede comprender además una sal, particularmente una sal inorgánica, más particularmente NaCl. Opcionalmente, la sal está presente en una concentración de 30 mM a 200 mM, particularmente de 40 mM a 150 mM, más particularmente de 50 mM a 100 mM, muy particularmente de 56 ± 2 mM. La presencia de una sal, particularmente NaCl, es beneficiosa para reducir la viscosidad que aumenta en las muestras que contienen el PEG. Por la misma razón, también es beneficioso incluir sorbitol y/o glicina.

La composición farmacéutica puede comprender además un agente modificador de la tonicidad. El agente modificador de la tonicidad puede seleccionarse del grupo que consiste en glicerol, aminoácidos, cloruro de sodio, proteínas, azúcares y alcoholes de azúcar. En una modalidad particular, el agente modificador de la tonicidad es un azúcar, más particularmente el agente modificador de la tonicidad es la sacarosa. Se encontró que un agente modificador de la tonicidad, en particular la sacarosa, tiene un efecto ventajoso sobre la composición farmacéutica ya que reduce la agregación del agente activo, específicamente el péptido de FGF-21 mutante (conjugado).

El agente modificador de la tonicidad, particularmente la sacarosa, puede estar presente en una concentración de 50 mM a 200 mM, más particularmente en una concentración de 100 mM a 175 mM, incluso más particularmente en una concentración de 135 mM a 160 mM, y muy particularmente en una concentración de 150 ± 2 mM.

Además, la composición farmacéutica puede comprender un surfactante, particularmente un surfactante no iónico. El surfactante o surfactante no iónico es particularmente un surfactante no iónico a base de polisorbato, particularmente polisorbato 20 o polisorbato 80, e incluso más particularmente polisorbato 20. Se encontró que un surfactante, en particular el polisorbato 20, reduce las partículas subvisibles por debajo de 10 mm y, por tanto, parece tener un efecto estabilizador sobre la composición farmacéutica.

El surfactante o surfactante no iónico, particularmente el polisorbato 20 u 80, más particularmente el polisorbato 20, se presenta opcionalmente en una concentración de 0,01 mg/ml a 1 mg/ml, particularmente en una concentración de 0,05 a 0,5 mg/ml y muy particularmente en una concentración de $0,2 \pm 0,02$ mg/ml. Se encontró que el polisorbato 20 u 80, particularmente el polisorbato 20, estabiliza la formulación a la agregación.

En una modalidad particular, una composición farmacéutica comprende 0,1 a 50 mg/ml, particularmente 33 ± 7 mg/ml de conjugado del péptido de FGF-21 mutante; 1 mM a 100 mM, particularmente 20 ± 2 mM, de agente tampón, particularmente un tampón Tris; 30 mM a 200 mM, particularmente 70 ± 2 mM, de sal, particularmente NaCl; y tiene un pH de $7,5 \pm 0,3$ (particularmente medido a 25 ± 2 °C).

Una composición farmacéutica más particular comprende 0,1 mg/ml a 50 mg/ml, particularmente 26 ± 4 mg/ml del conjugado del péptido de FGF-21 mutante; 1 mM a 100 mM, particularmente 16 ± 2 mM, de agente tampón, particularmente un tampón Tris; 30 mM a 200 mM, particularmente 56 ± 2 mM de sal, particularmente NaCl; 50 mM a 200 mM; del agente modificador de la tonicidad, particularmente la sacarosa; y 0,01 mg/ml a 1 mg/ml, particularmente $0,2 \pm 0,02$ mg/ml, de surfactante o surfactante no iónico, particularmente el polisorbato 20; y tiene un pH de $7,5 \pm 0,3$ (particularmente medido a 25 ± 2 °C).

En la presente descripción se proporciona además un contenedor farmacéutico que comprende el conjugado del péptido de FGF-21 mutante de la invención y como se describe en la presente descripción, o la composición farmacéutica de la invención y como se describe en la presente descripción. En una modalidad particular, el contenedor farmacéutico es una jeringa, un vial, una botella de infusión, una ampolla, un carpule, una jeringa equipada con un sistema de protección de la aguja, y un carpule dentro de una pluma de inyección.

La presente invención proporciona además un método para producir el conjugado del péptido de FGF-21 mutante de la invención, que comprende las etapas de:

- (1) producir de forma recombinante el péptido de FGF-21 mutante, particularmente en un huésped de expresión;
- y
- (2) unir enzimáticamente al péptido de FGF-21 mutante de la etapa (1) una fracción de PEG-glucosilo, en donde el PEG es de 20 kDa, y en donde la etapa (2) es particularmente un proceso in vitro, sin células, de esta manera se forma el conjugado del péptido de FGF-21 mutante.

En una modalidad particular, el método es el siguiente: Primero la mutación que introduce la treonina adyacente a, y en el lado C-terminal de un residuo de prolina y opcionalmente una o más mutaciones adicionales, se introducen en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el FGF-21 nativo o mutado, del FGF-21 humano como en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de FGF-21 mutado se introduce entonces en un vector de expresión adecuado para la expresión de proteínas en un huésped de expresión. Los métodos para introducir mutaciones en secuencias de ácidos nucleicos, tales como la mutagénesis sitio-dirigida, y la incorporación de la secuencia de ácidos nucleicos mutada en un vector de expresión son bien conocidos por el experto (cf. por ejemplo, "A Guide to Methods in the Biomedical Sciences" por R.B. Corley, Springer Science & Business Media, 2006).

Después de la expresión de la proteína, purificación opcional, el residuo de PEG se une al péptido de FGF-21 mutante, específicamente en el residuo de treonina recién introducido a través de la fracción de glucosilo y a través del residuo de glicina que está presente entre el PEG y el residuo de glucosilo.

Para obtener la expresión de alto rendimiento de un ácido nucleico que codifica un FGF-21 mutante de la presente invención, típicamente se subclona un polinucleótido que codifica el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción y un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, supra, y Ausubel y otros, supra. Los sistemas de expresión bacteriana para expresar el FGF-21 nativo o mutante están disponibles en, por ejemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus sp.*, *Salmonella* y *Caulobacter*. Los kits para tales sistemas de expresión están disponibles de comercialmente. Los sistemas de expresión eucariotas para células de mamíferos, levaduras y células de insectos se conocen bien en la técnica y también están disponibles comercialmente. En una modalidad, el vector de expresión eucariota es un vector adenoviral, un vector adenoasociado o un vector retroviral. En una modalidad particular, el péptido de FGF-21 mutante se produce de forma recombinante en las células de *E. coli*, es decir, el huésped de expresión es *E. coli*.

En este párrafo se describe un método de producción ilustrativo: El péptido de FGF-21 mutante se expresa en *E. coli* como cuerpos de inclusión. Las células se recuperan de la cosecha mediante centrifugación, se rompen y los cuerpos de inclusión se lavan y se recuperan mediante centrifugación. La purificación del péptido de FGF-21 mutante no pegilado comienza con solubilizar el péptido de FGF-21 mutante a partir de los cuerpos de inclusión y el replegado del péptido. El péptido de FGF-21 mutante replegado se filtra y purifica mediante dos operaciones de cromatografía de intercambio aniónico, ambas utilizan una resina de cromatografía Eshmuno Q y operan en modo de unión y elución. Si es necesario, el péptido de FGF-21 mutante purificado puede concentrarse mediante ultrafiltración mediante el uso de membranas Pellicon 2 (MWCO 5 kD). El péptido de FGF-21 mutante purificado se dispensa en botellas de PETG estériles y puede almacenarse a $\leq 70^{\circ}\text{C}$.

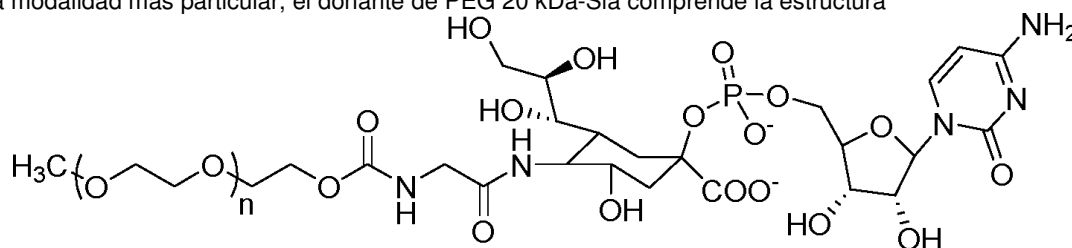
La glucopégilación del péptido de FGF-21 mutante puede realizarse mediante dos reacciones enzimáticas realizadas en serie o al mismo tiempo. Esta etapa puede ir seguida de una filtración de 0,2 mm y dos operaciones de cromatografía de intercambio aniónico, ambas utilizan una resina de cromatografía de flujo rápido de Q Sepharose y operan en modo de unión y elución. Puede realizarse una etapa de concentración final mediante ultrafiltración mediante el uso de Pellicon XL Biomax (MWCO 10 kDa). Las Figuras 3 a 5 ilustran un método de producción ilustrativo.

Se usan dos clases principales de enzimas en la síntesis de carbohidratos, glucosiltransferasas (por ejemplo, sialiltransferasas, oligosacariltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas) y glucosidasas. Las glucosidasas se clasifican además como exoglucosidasas (por ejemplo, β -manosidasa, β -glucosidasa) y endoglucosidasas (por ejemplo, Endo-A, Endo-M). Cada una de estas clases de enzimas se ha usado con éxito de manera sintética para preparar carbohidratos. Para una revisión general, véase Crout y otros, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 98- 111 (1998). Véase también los números de publicación del PCT: WO 2003/031464; WO 2005/089102; WO 2006/050247; y WO 2012/016984.

En una modalidad particular, la etapa (2) comprende una etapa (2a) de poner en contacto el péptido de FGF-21 mutante con un donante de GalNAc y una GalNAc transferasa en condiciones adecuadas para transferir la GalNAc del donante de GalNAc a al menos un residuo de treonina del péptido de FGF-21 mutante. Las condiciones para esta transferencia se describen en la sección Ejemplo. Opcionalmente, el donante de GalNAc es UDP-GalNAc y, particularmente, la GalNAc transferasa es la MBP-GalNAcT2.

En una modalidad particular y más particularmente en combinación con la modalidad del párrafo antes mencionado, la etapa (2) comprende, además, particularmente en combinación con la etapa (2a), una etapa (2b) de poner en contacto el producto de la etapa (2a), con un donante de PEG 20 kDa-Sia y una sialiltransferasa en condiciones adecuadas para transferir el PEG 20 kDa-Sia del donante de PEG 20 kDa-Sia a la GalNAc en el péptido de FGF-21 mutante. Opcionalmente, el donante de PEG 20 kDa-Sia es el PEG 20 kDa-Sia-CMP y/o la sialiltransferasa es la ST6GalNAc1. Como ya se ha explicado en general anteriormente, el término "PEG 20 kDa-Sia" incluye además el "PEG 20 kDa -enlazador-Sia" y el "PEG 20 kDa-Gly-Sia".

En una modalidad más particular, el donante de PEG 20 kDa-Sia comprende la estructura



en donde n es un número entero seleccionado de 450 a 460, lo que resulta en un peso molecular de 20 kDa. Esta estructura incluye un enlazador Gly. El experto entiende que los métodos para producir los mismos se describen en la publicación del PCT núm. WO 2003/031464.

Después de la expresión y antes de la reacción de glucopégilación, es conveniente purificar el péptido de FGF-21 mutante. Por ende, opcionalmente, el método comprende además una etapa (3), después de la etapa (1) y antes de la etapa (2), de purificar el péptido de FGF-21 mutante después de la producción recombinante. Además, el método puede comprender una etapa (4), después de la etapa (2), de purificar el conjugado del péptido de FGF-21 mutante formado en la etapa (2).

La etapa de purificación (3) y/o (4) puede comprender someter el péptido de FGF-21 mutante a un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, filtración y sus combinaciones. La etapa (3) y/o la etapa (4) pueden comprender una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, filtración o sus combinaciones.

La etapa (3) y/o la etapa (4) pueden comprender particularmente someter el péptido de FGF-21 mutante a una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico, más particularmente a al menos dos etapas de cromatografía de intercambio iónico, incluso más particularmente la cromatografía de intercambio aniónico. En una modalidad más particular, el péptido de FGF-21 mutante se somete a dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico, más particularmente a dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico fuerte en la etapa (3) y en la etapa (4).

La cromatografía de intercambio aniónico emplea particularmente un miembro seleccionado del grupo que consiste en una matriz base de éter polivinílico hidrófilo, dietilaminoetanol (DEAE), trimetilamonioetil (TEAE), agarosa, matriz polimérica de poliestireno/divinilbenceno, una cromatografía de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario (Q) y sus combinaciones, incluso más particularmente en la etapa (3) se usan dos columnas que usan una matriz base de éter polivinílico hidrófilo, muy particularmente en la etapa (3) se usan dos columnas Eshmuno®-Q. Las resinas Eshmuno®-Q que tienen una matriz base de éter polivinílico hidrófilo están disponibles, por ejemplo, en Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. Las resinas Source 15Q también son de uso en la presente invención (GE Health Care Life Sciences, Chalfont St Giles, Reino Unido). La cromatografía de afinidad puede ser una cromatografía de afinidad aniónica con colorante de antraquinona y la filtración puede emplear una membrana hidrófila modificada de poliétersulfona (PES). En otra modalidad, se realizan dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico débil o una etapa de cromatografía de intercambio aniónico fuerte y una etapa de cromatografía de intercambio aniónico débil.

En una modalidad alternativa, la purificación en la etapa (3) se realiza como se muestra más abajo, opcionalmente en el orden dado:

1. cromatografía de intercambio iónico, particularmente cromatografía de intercambio aniónico,
2. opcionalmente cromatografía de afinidad,
3. opcionalmente cromatografía de intercambio iónico, particularmente cromatografía de intercambio aniónico, y
3. filtración.

La purificación ilustrativa se realiza en la sección Ejemplo. En general, las etapas de purificación por cromatografía deben realizarse de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se puede obtener información adicional, por ejemplo, de "Protein Purification Protocols", Paul Cutler, Springer Science & Business Media, 2004).

En una modalidad opcional, el método comprende además una etapa (4), después de la etapa (2), de purificar el

conjugado del péptido de FGF-21 mutante formado en la etapa (2), particularmente mediante cromatografía de intercambio iónico, más particularmente mediante cromatografía de intercambio aniónico fuerte, incluso más particularmente mediante cromatografía de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario (Q). En una modalidad particular, en la etapa (4) se realizan dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico. La Q Sepharose es un material de columna más particular adecuado para purificar el conjugado del péptido de FGF-21 mutante de la presente invención en la etapa (4). La Q Sepharose está disponible, por ejemplo, en GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, Estados Unidos.

En una modalidad particular, la arginina se añade en las etapas (2) y (3), particularmente al menos 400 mM de arginina. La arginina se añade opcionalmente para inhibir las proteasas que, de cualquier otra manera, degradarían la proteína. Por ende, la arginina ayuda a prevenir la pérdida de proteínas.

Finalmente, se elimina la endotoxina que puede originarse del huésped de expresión en una etapa opcional (5), después de la etapa y antes de la etapa (2). En esta etapa, el producto de la etapa (3) se filtra mediante el uso de un filtro de eliminación de endotoxinas, tal como el filtro de 0,2 micras, Mustang E.

Además, el conjugado del péptido de FGF-21 mutante puede esterilizarse por filtración.

También se proporcionan los conjugados del péptido de FGF-21 mutante que pueden obtenerse mediante el método de la invención.

La presente invención también proporciona el conjugado del péptido de FGF-21 mutante de la invención y/o la composición farmacéutica de la invención para su uso como un medicamento y para su uso en el tratamiento de la diabetes y enfermedades relacionadas, particularmente la diabetes tipo 2, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y/o el síndrome metabólico. La invención también proporciona el uso del conjugado del péptido de FGF-21 mutante de la invención y/o el uso de la composición farmacéutica de la invención para el tratamiento de la diabetes y enfermedades relacionadas, particularmente la diabetes tipo 2, la NASH y/o el síndrome metabólico.

La NAFLD es una hepatopatía crónica común en países occidentales, que puede progresar a la cirrosis y se asocia con un aumento del riesgo de mortalidad en general y un aumento del riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en particular. El tratamiento farmacológico actual de la NAFLD tiene una eficacia limitada y, por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar agentes más efectivos y seguros para esta enfermedad común y potencialmente mortal. El ácido obeticolico (OCA), un agonista selectivo de los receptores X farnesoides, parece prometedora como agente terapéutico para el manejo de la NAFLD. El estudio clínico ácido obeticolico ligando de receptores X farnesoides en el tratamiento de NASH (Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic Acid in NASH Treatment, FLINT) en pacientes con NASH, reveló que la administración de OCA se asocia con mejoras en la histología hepática, así como con la pérdida de peso y la reducción de la tensión arterial. Aunque sus efectos adversos sobre el lipidograma y la sensibilidad a la insulina son notables, el OCA podría considerarse en pacientes seleccionados con NAFLD/NASH, particularmente aquellos con niveles de glucosa y lípidos controlados adecuadamente.

Con respecto a los indicadores que demuestran la eficacia clínica de los compuestos y composiciones descritos en la presente descripción, en la técnica se conocen una variedad de indicadores ilustrativos y descritos en la presente descripción que incluyen, sin limitarse a, una reducción en la HbA1c, la glucosa y la insulina, el peso corporal, lípidos séricos (colesterol total, LDL, triglicéridos), enzimas hepáticas (ALT, AST), peso hepático, peso hepático relativo (% de peso corporal), puntuación de actividad NAFLD (NAS), puntuación de la fibrosis (por ejemplo, fibrosis hepática), citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL1 β , MCP-1), biomarcadores de fibrosis (α SMA, Colágeno 1 alfa), colesterol hepático, triglicéridos hepáticos y ácidos grasos hepáticos. Los aumentos en al menos la adiponectina de alto peso molecular (HMW) o las HDL son también indicadores de la eficacia clínica de los compuestos y las composiciones descritos en la presente descripción. Véase, por ejemplo, las Figuras 8-20 y sus descripciones. En consecuencia, un cambio (como se indicó anteriormente) en al menos uno de los indicadores refleja la eficacia clínica de un compuesto o composición descrito en la presente descripción.

En una modalidad particular, la eficacia terapéutica de un compuesto o composición descrito en la presente descripción se determina en base a una reducción en al menos uno de los niveles de triglicéridos séricos o niveles de insulina sérica. Véase, por ejemplo, la Tabla 5.

El HOMA-IR es, por ejemplo, un indicador de la presencia y la medida de resistencia a la insulina en un sujeto. Es un indicador preciso de la dinámica entre los niveles iniciales (en ayunas) de glucemia y los niveles de insulina que responden a estos. Se denomina calculadora de resistencia a la insulina. Para los humanos, un intervalo saludable es 1,0 (0,5-1,4). Menos de 1,0 indica que un sujeto es sensible a la insulina, lo cual es ideal; por encima de 1,9 indica que un sujeto exhibe resistencia temprana a la insulina; por encima de 2,9 indica que un sujeto exhibe resistencia significativa a la insulina. El cálculo del código sanguíneo HOMA-IR se determina de la siguiente manera: insulina uUI/ml (mU/l) X glucosa (mg/dl) = HOMA-IR. El cálculo requiere las unidades estándar de Estados Unidos. Para convertir desde unidades internacionales del SI: para la insulina: pmol/l a uUI/ml, dividir (+) por 6; para la glucosa: mmol/l a mg/dl, multiplicar (X) por 8.

También se presenta en la presente descripción la pauta terapéutica, de manera que una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado del péptido de FGF-21 mutante se administra dos veces al día, una vez al día, cada dos días, tres veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez al mes. La eficacia de larga duración de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante descritos en la presente descripción se evidencia por la semivida sorprendentemente larga determinada para estos conjugados en sistemas de modelos animales. Véase, por ejemplo, los Ejemplos 11, 12, y 13 de la presente descripción. La eficacia de larga duración de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante descritos en la presente descripción, a su vez, hace posible administrar los conjugados del péptido de FGF-21 mutante con menos frecuencia. En consecuencia, en una modalidad particular, un conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción o una composición que comprende el mismo se administra a un sujeto que lo necesita a una frecuencia igual o superior a una vez por semana. Por ejemplo, el conjugado del péptido de FGF-21 mutante descrito en la presente descripción, o una composición que comprende el mismo, puede administrarse a un sujeto que lo necesita una vez cada 7 días, una vez cada 8 días, una vez cada 9 días, una vez cada 10 días, una vez cada 11 días, una vez cada 12 días, una vez cada 13 días, una vez cada 14 días, una vez cada 15 días, una vez cada 16 días, una vez cada 17 días, una vez cada 18 días, una vez cada 19 días, una vez cada 20 días, una vez cada 21 días, una vez cada 22 días, una vez cada 22 días, una vez cada 23 días, una vez cada 24 días, una vez cada 25 días, una vez cada 26 días, una vez cada 27 días, una vez cada 28 días, una vez cada 29 días, una vez cada 30 días, o una vez cada 31 días.

En otra pauta terapéutica ilustrativa, los compuestos descritos en la presente descripción y las composiciones que comprenden los mismos siguen un curso de terapia de "inducción", que requiere una administración más frecuente tal como dos veces a la semana o semanalmente al inicio de la pauta terapéutica, seguido de la terapia de mantenimiento, que puede implicar una administración quincenal o una vez al mes. Tal pauta terapéutica es efectiva porque la terapia de inducción inicial mejora la afección del sujeto a un nivel manejable que es aceptable con respecto a lograr un estado clínico que es aceptable para el mantenimiento de la enfermedad/afección. Posteriormente, la terapia de mantenimiento se usa para conservar el nivel de bienestar a nivel de mantenimiento.

La eficacia terapéutica de un compuesto y/o composición para tratar la diabetes y enfermedades relacionadas, particularmente la diabetes tipo 2, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y/o el síndrome metabólico pueden evaluarse mediante el uso de una variedad de parámetros y ensayos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en la presente descripción. La medición de la HbA1C se considera un ensayo estándar para medir el índice glucémico de un sujeto durante un período de larga duración. Por lo tanto, es un indicador estable del índice glucémico, que refleja los niveles de glucosa durante el curso de aproximadamente los últimos 3-4 meses. En consecuencia, un sujeto que tiene diabetes (por ejemplo, diabetes tipo 2) puede definirse por el porcentaje de HbA1C determinado en un ensayo adecuado.

Para una persona saludable sin diabetes, el intervalo normal para el nivel de hemoglobina A1c está entre el 4 % y el 5,6 %. Los niveles de hemoglobina A1c entre el 5,7 % y el 6,4 % indican que una persona tiene una mayor probabilidad de desarrollar diabetes. Los niveles de 6,5 % o mayores indican que una persona tiene diabetes.

En una modalidad particular, la HbA1C se mide con HPLC mediante el uso del sistema de prueba de glucohemoglobina (BIO-RAD, Hercules, CA, Estados Unidos). Las muestras de sangre (por ejemplo, 1,0 ml/por tiempo) pueden recolectarse de la vena cefálica o safena en tubos BD Vacutainer® K2-EDTA. Las muestras pueden almacenarse inmediatamente a 4 °C o mantenerse en hielo común y analizarse el mismo día en que se recolectó la sangre. Los niveles de HbA1c en la sangre pueden medirse por los expertos en la técnica con HPLC mediante el uso del sistema de prueba de glucohemoglobina (BIO-RAD, Hercules, CA, Estados Unidos).

Con respecto a la NASH, esta afección se diagnostica actualmente solo mediante biopsia. Sin embargo, hay algunos biomarcadores indirectos que se consideran predictivos de la NASH, tales como la grasa hepática (determinada por la MRI), las enzimas hepáticas (ALT y relación ALT/AST) y los biomarcadores de la fibrosis, tal como el pro-C3.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de los mutantes de FGF-21

1.1 Vector de expresión y ADNc para FGF-21

El vector de expresión usado para este proyecto se designó pCWM3. El vector tiene el promotor fuerte TAC para impulsar la expresión con un potenciador de la traducción GT10. Los sitios seleccionados para la incorporación del ADNc fueron NdeI y XhoI. Se optimizaron los codones de un ADNc que codifica para la forma madura de longitud completa del gen FGF21 humano para la expresión en *E. coli* y se sintetizó por BlueHeron en base a la secuencia publicada (núm. de acceso del NCBI NM_019113). El gen se amplificó por PCR mediante el uso de 2 conjuntos de oligonucleótidos que incorporarían las mutaciones deseadas y sitios de restricción para construir los vectores de expresión.

1.2 Solapamiento de las reacciones de PCR para generar construcciones de FGF-21 mutantes.

Secuencia de oligonucleótidos con sitios de restricción subrayados (NdeI y XhoI respectivamente).

5' oligo 5' GAGGTCATATGCATCCAATTCCAGATTC3' (PCR de la segunda etapa, SEQ ID NO: 29).

3' oligo 5' ATTCCTCGAGTTATTAAGAGGCGTAG3' (PCR de la segunda etapa, SEQ ID NO: 30).

El gen de FGF-21 humano nativo (5 mg) se suministró por BlueHeron en 200 ml de agua (75 ng/ml).

Reacción de PCR	Programa de PCR en el termociclador
0,2 µl de 15 ng de ADN	1) 95 °C 5'
4 µl oligo 5' 2,5 µM	2) 95 °C 30"
4 µl oligo 3' 2,5 µM	3) 45 °C 30"
2 µl de tampón de PCR 10X con MgCl ₂	4) 72 °C 30" regreso a 2) 5 veces
0,4 µl de dNTP 10 mM cada uno	5) 95 °C 30"
0,4 µl de Pfu Ultra 2,5 U/µl	6) 50 °C 30"
9 µl de H ₂ O	7) 72 °C 30" Repita hasta 5) 20 veces
	8) 72 °C 5'

5 La mezcla se monta en placas de PCR de 96 pocillos de pared fina de 0,2 ml estériles mediante el uso de puntas de pipeta estériles resistentes a aerosoles.

10 Las reacciones de PCR (20 µl) se mezclaron con 5 µl de colorante de carga 6X en placas de 96 pocillos antes de cargarlas en el gel de agarosa. Un gel de agarosa al 1,5 % se sometió a electroforesis a 100 V mediante el uso de un tampón TAE. Se aisló y procesó una porción de gel del producto de PCR en gel con el uso del kit de extracción de gel Qiaquick, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se eluyó con 50 µl de H₂O. Para conservar el espacio, las bandas de cada par correspondiente a los productos de PCR primarios que se usarán en la segunda etapa de PCR para generar el mutante de longitud completa se combinaron en el pocillo de extracción del kit.

15 También se generaron mutantes que eran productos de la reacción de PCR de una sola etapa como se describió anteriormente para los productos de PCR de la primera etapa.

La segunda etapa de la reacción de PCR se llevó a cabo de la siguiente manera:

Reacción de PCR	Programa de PCR en el termociclador
10 µl de ADN (de la extracción del gel)	1) 95 °C 5'
0,4 µl oligo 5' 25 µM	2) 95 °C 30"
0,4 µl oligo 3' 25 µM	3) 45 °C 30"
2 µl de tampón de PCR 10X con MgCl ₂	4) 72 °C 30" Repita hasta 2) 5 veces
0,4 µl de dNTP 10 mM cada uno	5) 95 °C 30"
0,4 µl de Pfu Ultra 2,5 U/µl	6) 50 °C 30"
3,6 µl de H ₂ O	7) 72 °C 30" Repita hasta 5) 20 veces
	8) 72 °C 5'

20 Los productos de PCR se purificaron mediante el kit de purificación de PCR Qiaquick y se eluyeron con 50 µl de agua de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de digestión por restricción se realizaron en tubos de centrífuga de 0,5 ml esterilizados en autoclave de la siguiente manera, en los productos de PCR purificados y en el vector pCWM3:

25

14 µl de elución de ADN	4 µl de ADN plasmídico de pCWM3 de la miniprep
2 µl de BSA 10X	2 µl de BSA 10X
2 µl de tampón NEB	4 µl de tampón NEB 4
1 µl de Nde I	1 µl de Nde I
1 µl de XhoI	1 µl de XhoI
	10 µl de agua

Las reacciones se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Luego se añadieron 4 µl de tampón de carga de ADN 6X antes de cargarlas en un gel de agarosa al 1,5 % con SYBR Green, y se sometieron a electroforesis en tampón TAE durante 60 minutos a 100 V.

Se aisló y procesó una porción de gel del producto de PCR con el kit de extracción de gel Qiaquick, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se eluyó con 50 µl de H₂O.

5 1.3 Reacciones de ligazón para insertar los genes FGF21 mutantes en el vector de expresión pcMW3

Las ligazones se realizaron mediante la combinación de los reactivos enumerados más abajo en tubos eppendorf de 0,5 ml esterilizados en autoclave:

- 10 0,2 µl de pCWM3 (digerido con Nde1 y Xho1 y aislado del gel de agarosa)
 1 µl de producto de PCR (digerido con Nde1 y Xho1 y aislado del gel de agarosa)
 1 µl de tampón de ligasa NEB 10X
 0,5 µl de ADN ligasa T4 de NEB
 7,3 µl de agua

15 Incube durante 1 hora a temperatura ambiente.

1.4 Transforme *E. coli* TOP10 competentes con la reacción de ligazón.

- 20 Añada 1 µl de cada reacción de ligazón a 25 µl de células Top10 químicamente competentes descongeladas en un tubo de microcentrífuga de 1,5 µl esterilizado en autoclave. Las células se sometieron a choque térmico mediante la incubación a 42 °C durante 1 minuto. Las células se transfirieron a un cubo de hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 175 µl de SOC precalentado y los tubos se incubaron durante 60 minutos a 37 °C en una plataforma giratoria establecida a 250 rpm. La selección de los transformantes se logró al sembrar por diseminación la reacción de transformación en placas de agar Martone que contenían 50 µg/ml de sulfato de kanamicina. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C. 3 colonias de cada FGF21 mutante se sometieron a una nueva siembra por estrías en dos placas de agar Martone-Kan50 y una se envió a Genewiz para la amplificación y secuenciación de la colonia. Se identificaron las secuencias correctas para los 46 mutantes.

30 Ejemplo 2: Preparación de ADN por Miniprep y generación de las reservas de glicerol

- La colonia correcta identificada mediante secuenciación se amplificó durante toda la noche en 3 ml de caldo Martone L complementado con 50 µg/ml de sulfato de kanamicina. El ADN se aisló a partir de 1,5 ml de cultivo mediante el uso del kit de miniprep de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN de la Miniprep se almacenó a -20 °C en tubos eppendorf de 1,5 ml. También se congelaron 120 µl de cultivo con 80 µl de solución de glicerol al 50 % para generar una concentración final de glicerol al 20 %. Las reservas se congelaron a -80 °C en una placa de 96 pocillos.

- 40 Células Origami2 químicamente competentes (25 µl) se transformaron como se describió anteriormente con 1 µl de ADN de la miniprep de las construcciones y la selección de los transformantes se logró en las placas de agar Martone-Kan50, también como se describió anteriormente. Se creció un cultivo durante toda la noche a partir de un raspado de varias colonias en 2 ml de caldo Martone L complementado con 50 µg/ml de sulfato de kanamicina seguido de un crecimiento durante toda la noche a 37 °C en una plataforma de agitación establecida a 250 rpm. Al día siguiente, se mezclaron 120 µl de cultivo con 80 µl de glicerol al 50 % para generar una concentración final de glicerol al 20 %. Las reservas en glicerol se congelaron a -80 °C en una placa de 96 pocillos.

Ejemplo 3: Creación de líneas celulares que expresan FGF-21

- 50 El ADN plasmídico que codifica FGF-21 (tipo salvaje, SEQ ID NO: 1) y cada uno de los mutantes de FGF-21 se obtuvo de Teva (Petach Tikva, Israel). La preparación del ADN plasmídico mediante el uso del vector pCWM3 se describe en el Ejemplo 1. Todas las líneas celulares de *E. coli* se prepararon de acuerdo con el siguiente procedimiento. Las células Origami-2 (Novagen) químicamente competentes se descongelaron en hielo y se colocaron 10 µl de la suspensión celular en un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml esterilizado en autoclave a 4 °C (hielo). El ADN plasmídico (1 µl) se diluyó a 1:10 con agua estéril, se añadió a las células y luego se mezcló mediante golpes suaves al tubo. El tubo se dejó incubar durante 30 minutos en hielo. Luego el tubo de microcentrífuga se colocó en baño maría a 42 °C, y se incubó durante 45 segundos. Luego el tubo se enfrió en hielo durante dos minutos. Luego se añadieron trescientos microlitros de medio SOC (TekNova, Hollister, CA, Estados Unidos) al tubo y este se incubó a 37 °C durante una hora. Esta mezcla de reacción (100 µl) se sembró por diseminación en placas de agar precalentadas (37 °C) que contenían 50 µg/ml de sulfato de kanamicina. Estas placas de agar se colocaron boca abajo en una incubadora a 37 °C y se incubaron durante 16-24 horas. Las placas se sellaron con parafilm y se almacenaron a 4 °C. Las placas pueden almacenarse durante varios días mediante el uso de este método.

- 65 Se seleccionaron tres colonias individuales de las placas de agar en base al tamaño y la forma y se inocularon (con un asa bacteriológica) en 2 ml de Caldo LB (TekNova, Hollister, CA, Estados Unidos) que contiene 25 µg/ml de sulfato de kanamicina. Los tubos inoculados se incubaron durante 6-8 horas en una incubadora con agitación

establecida a 250 rpm y 37 °C. Las células se cosecharon mediante centrifugación (10 000 x g durante 2 minutos) y se hicieron alícuotas (50 µl) del cultivo. Los sedimentos celulares se congelaron y analizaron mediante el análisis de SDS-PAGE (se designaron como sedimento celular no inducido). Las reservas en glicerol se crearon en una campana de flujo laminar al combinar 200 µl de una solución de glicerol al 50 % con 300 µl de cultivo celular en viales de congelación Nalgene estériles rotulados. Los viales se agitaron en un mezclador de vórtice y se almacenaron a -80 °C.

El cultivo restante se transfirió a una incubadora con agitación establecida a 20 °C y 250 revoluciones por minuto (rpm) y se incubaron durante 30 minutos. Se añadió IPTG (solución de 1 M) al cultivo para producir una concentración final de 0,5 mM y el cultivo se incubó durante otras 12-16 horas en la incubadora con agitación (20 °C y 250 rpm). Luego se retiró una alícuota de 50 µl del tubo de fermentación, se centrifugó (10 000 x g durante 2 minutos) y el sedimento celular se designó como sedimento celular inducido. Los sedimentos celulares no inducidos e inducidos se resuspendieron en 50 µl de reactivo de extracción de proteínas bacterianas B-PER complementado con ADNasa y lisozima, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Las suspensiones celulares se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El lisado celular del cultivo inducido se centrifugó a 20 000 x g durante 2 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se designó como lisado celular inducido (S en los geles). El sedimento restante se designó como sedimento celular inducido (P en los geles). El lisado celular total no inducido se designó como UI en los geles. Estas muestras se analizaron mediante SDS-PAGE como se describe más abajo para determinar los niveles de expresión de FGF-21. Se seleccionó la colonia que produjo el nivel más alto de expresión de FGF-21 soluble (de tipo salvaje y/o mutante) para producir las proteínas de interés en este estudio.

Ejemplo 4: Expresión de FGF-21 (tipo salvaje) y mutantes de FGF-21

La colonia que produjo el nivel más alto de expresión del mutante de FGF-21 se seleccionó en base a la intensidad de la mancha de la banda de FGF-21 a partir de los cultivos inducidos de dos mililitros descritos en el Ejemplo 3. Los tubos que contenían medios de cultivo (3 ml de caldo LB con peptona de soya sin derivados animales, complementados con 25 µg/ml de sulfato de kanamicina) se inocularon con un raspado de la reserva de glicerol correspondiente al mayor productor. Los cultivos crecieron durante toda la noche (12-16 horas) a 37 °C y 250 rpm. Estos cultivos iniciales (1 ml) se usaron para inocular 1 l de caldo LB que contenía 25 µg/ml de sulfato de kanamicina. El matraz se incubó (37 °C a 250 rpm) hasta que la DO₆₀₀ del cultivo de fermentación había alcanzado 0,6-0,8. En este momento, el matraz se transfirió a otra incubadora con agitación establecida a 20 °C y 250 rpm y se incubó durante 45 a 60 minutos. Luego se midió la DO₆₀₀ y se añadieron 500 µl de solución de IPTG 1M a cada matraz y la fermentación continuó a 20 °C y 250 rpm durante 12-16 horas. Justo antes de la cosecha, se midió la DO₆₀₀ de cada matraz. Luego los matraces se transfirieron a botellas de centrifuga de 1 l y las células se sedimentaron en una centrífuga Sorvall RC-3B-PLUS mediante centrifugación a 4657 x g durante 30 minutos y a 4 °C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente en lejía y se desechó. Las células se resuspendieron en 30 a 50 ml de agua destilada y se transfirieron a tubos de centrifuga cónicos de 50 ml previamente pesados. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 3220 x g durante 15 minutos y a 4 °C, los sobrenadantes se retiraron (decantaron) y los sedimentos húmedos individuales de células se pesaron y se congelaron a -80 °C.

La expresión de todos los FGF-21 de tipo salvaje y mutantes resultó en rendimientos suficientes entre 11 y 70 mg por litro de producto fermentado en base a los rendimientos aislados calculados después de la purificación y formulación (Figura 2).

Ejemplo 5: Lisis y purificación de FGF-21 (tipo salvaje) y los mutantes de FGF-21

Los mutantes de FGF-21 y el FGF-21 se purificaron mediante el uso de una combinación de cromatografía IEX (Source 15Q), cromatografía de afinidad (azul de Sepharose) y filtración a través de una membrana Mustang Q (proceso 1). También se desarrolló una estrategia de purificación alternativa en la que se purificó otra vez el mutante de FGF-21 mediante el uso de la cromatografía Source 15Q hasta que se eliminó la proteasa de *E. coli* (proceso 2). Mediante el uso del proceso posterior, habitualmente dos etapas de purificación por IEX eliminaron toda la proteasa residual; sin embargo, también pueden realizarse tres o cuatro etapas de cromatografía IEX si es necesario.

Ambos procesos eliminaron cualquier proteasa restante y proporcionaron productos con una pureza superior al 98 %.

5.1 Proceso 1

5.1.1 Cromatografía IEX

El sedimento celular (5 gramos) del Ejemplo 4 se descongela y se añaden 20 ml de tampón (50 mM de Tris, pH 7,5). El sedimento se resuspende girando el tubo de un extremo a otro. La suspensión celular luego se pasó a través de un emulsionante de Avestin (Ottawa, ON, Canadá) tres veces a una presión de 25 000 psi para lisar las células y la suspensión se centrifugó (14 502 x g) durante 25 min. El sobrenadante se retiró mediante decantación y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm (sistema de filtración por vacío de 150 ml TPP) y el filtrado (conductividad ≤ 5 µS) se

cargó directamente en una columna de intercambio iónico (Source 15Q; 1,0 cm x 30 cm; 24 ml) equilibrada con tampón (50 mM Tris-HCl, pH 7,5). La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón de carga y el FGF-21 se eluyó mediante el uso de un gradiente lineal de tampón (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 0 a 200 mM de cloruro de sodio) sobre 20 volúmenes de columna a un régimen de flujo de 2,0 ml/min. El producto eluido se congela inmediatamente y se almacena a -80 °C para evitar la proteinólisis o se procesa inmediatamente a través de la siguiente etapa de cromatografía.

5.1.2 Cromatografía con azul de cibacron

Las fracciones que contienen el FGF-21 se combinan y diluyen diez veces con tampón (HEPES 50 mM pH 7,4) e inmediatamente se cargan en una columna TosoGel Blue (2 cm x 12 cm; 25 ml). Luego la columna se lava con ~100 ml (hasta que se haya obtenido el valor inicial) de tampón para eliminar el material que no se unió, a un régimen de flujo de 3,0 ml/min. El producto se eluyó mediante el uso de una elución por etapas con tampón (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM, arginina 400 mM) a 3 ml/min. Las fracciones de columna apropiadas se combinaron, el tampón se intercambió por un nuevo tampón (HEPES 20 mM, pH 6,8, NaCl 100 mM) y se filtró a través de un filtro de membrana Mustang Q (Pall, Port Washington, NY, Estados Unidos). Luego el filtrado se formuló y se almacenó a -80 °C. Esta etapa del proceso eliminó la proteasa para la mayoría de las proteínas FGF-21.

5.2 Proceso 2

5.2.1 Cromatografía IEX - etapa uno

El sedimento celular (5 gramos) del Ejemplo 4 se descongela y se añaden 20 ml de tampón (50 mM de Tris, pH 7,5). El sedimento se resuspende girando el tubo de un extremo a otro. La suspensión celular luego se pasó a través de un emulsionante de Avestin (Ottawa, ON, Canadá) tres veces a una presión de 25 000 psi para lisar las células y la suspensión se centrifugó (14 502 x g) durante 25 min. El sobrenadante se retiró mediante decantación y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm (sistema de filtración por vacío de 150 ml TPP) y el filtrado (conductividad ≤ 5 µS) se cargó directamente en una columna de intercambio iónico (Source 15Q; 1,0 cm x 30 cm; 24 ml) equilibrada con tampón (50 mM Tris-HCl, pH 7,5). La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón de carga y el FGF-21 se eluyó mediante el uso de un gradiente lineal de tampón (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 0 a 200 mM de cloruro de sodio) sobre 20 volúmenes de columna a un régimen de flujo de 2,0 ml/min. El producto eluido se congela inmediatamente y se almacena a -80 °C para evitar la proteinólisis o se procesa inmediatamente a través de la siguiente etapa de cromatografía.

5.2.2 Cromatografía IEX - etapa dos

Las fracciones que contienen FGF-21 se combinan y se diluyen cuatro veces con tampón (HEPES 50 mM pH 7,5) e inmediatamente se cargan en una columna IEX (Source 15Q; 1,0 x 30 cm; 25 ml) equilibrada con tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5). La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón de carga y el FGF-21 se eluyó mediante el uso de un gradiente lineal de tampón (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 0 a 200 mM de cloruro de sodio) sobre 20 volúmenes de columna a un régimen de flujo de 2,0 ml/min. Las fracciones que contenían el producto eluido se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C para evitar la proteinólisis, si es que hay alguna restante. Luego se realiza el ensayo de la proteasa mediante el uso de muestras pequeñas de cada fracción de columna para determinar si hay proteasa restante. Si la proteasa todavía está presente, el producto se purifica nuevamente mediante el uso de otra etapa de cromatografía IEX (Source 15Q), como se describió anteriormente. Luego las fracciones de columna se combinaron y formularon.

5.3 Producción a gran escala

Las Figuras 3, 4 y 5 ilustran la producción y purificación de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante inventivo a gran escala. La Figura 3 resume la fermentación, la cosecha celular y la obtención de los cuerpos de inclusión. La Figura 4 ilustra la solubilización de los cuerpos de inclusión y las etapas de purificación que pueden usarse de manera beneficiosa para purificar los péptidos de FGF-21 mutantes. El método de purificación mostrado que comprende dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico se identificó entre muchos otros protocolos de purificación tales como el uso de resinas DAE y SP Sepharose para dar los rendimientos más altos y la pureza más óptima de los péptidos de FGF-21 mutantes a partir de la expresión a gran escala. La Figura 5 ilustra el procedimiento de glucopigilación y el protocolo de purificación subsecuente que comprende dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico que resultaron en los rendimientos más altos y la pureza más óptima de los conjugados del péptido de FGF-21 mutante.

Ejemplo 6: Eliminación de la proteasa, formulación de los FGF-21 no pegilados y caracterización adicional

Todos los FGF-21 producidos mediante el uso de este sistema de expresión de *E. coli* se degradaron rápidamente por proteasas endógenas tras el almacenamiento a 4 °C mediante el uso de tampones del proceso de purificación o tampones de formulación. Por lo tanto, durante el procesamiento todas las muestras parcialmente purificadas se procesaron inmediatamente, o las fracciones intermedias se almacenaron congeladas (-80 °C) hasta que fue posible

un procesamiento adicional. La proteinólisis también puede inhibirse mediante la adición de altas concentraciones de arginina (≥ 400 mM) a los tampones.

Todos los FGF-21 purificados se probaron para la eliminación de la proteasa (estabilidad) mediante la incubación a 30 °C durante tres días. Para los mutantes de FGF-21 que todavía contenían proteasa después de la purificación inicial, se usó un enfoque de purificación, una segunda, tercera o cuarta etapa de cromatografía IEX (Source 15Q) para eliminar la proteasa restante. La eliminación completa de la proteasa de todas las muestras de FGF-21 fue esencial ya que la reacción de glucopegilación requiere la incubación a 30 °C durante toda la noche. No es posible la inhibición de la proteinólisis durante el proceso de glucopegilación mediante el uso de altas concentraciones de sal (por ejemplo, arginina, cloruro de sodio, etc.) ya que estas condiciones inhiben la reacción de glucopegilación.

La eliminación de la proteasa se determinó mediante la incubación de la muestra o fracción de columna (10-50 μ l) que contenía FGF-21 y la posible proteasa a 30 °C durante 1-3 días. La proteasa se consideró completamente retirada si no había ocurrido ninguna proteinólisis del FGF-21 después de 3 días. Se usó SDS-PAGE para determinar la medida de la proteinólisis. Se observó una eliminación completa de la proteasa después de la purificación de las fracciones IEX mediante el uso de la cromatografía con azul de cibacron.

Para el análisis de la SDS PAGE, se usaron geles planos con gradiente de poli(acrilamida) previamente vertidos Bis-Tris NuPAGE al 12 % o al 4-12 %. Las muestras se mezclaron en una relación 1:1 con el tampón de muestras LDS que contenía DTT 0,1 M y se calentaron a 95 °C durante 3 min, a menos que se señale de cualquier otra manera.

Los geles se corrieron a un voltaje constante de 200 V durante 40 min en tampón MES. Después de la electroforesis, las proteínas se tiñeron con la solución de tinción segura de SimplyBlue (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) durante 2 - 24 horas mientras se agitaban a 50 rpm, a temperatura ambiente según fuera necesario para visualizar las proteínas como describió el fabricante. Las proteínas estándar incluían masas de 188, 98, 62, 49, 38, 28, 17, 14 y 6 kDa (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos, estándares SeeBlue® Plus-2, núm. de cat. LC5925) o 220, 150, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 y 10 kDa (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos, estándares de proteínas preteñidos Novex® Sharp). Después de desteñir el gel con agua, las bandas de proteínas se visualizaron y se escanearon en un generador de imágenes de infrarrojo Li-Cor Odyssey® y se grabaron (LI-COR Inc., Lincoln, NE, Estados Unidos). (Figura 6)

Cada FGF-21 (de tipo salvaje) y mutantes (no pegilados) se formuló en un tampón (HEPES, 20 mM, pH 6,8; NaCl, 100 mM) a aproximadamente 1 mg de proteína por ml y se almacenó congelado (-80 °C). La eliminación de endotoxinas y la filtración estéril se realizaron mediante el uso de una unidad de disco de filtro de eliminación de endotoxinas (filtro de 0,2 micras, Mustang E). Los viales se sellaron y se almacenaron a -80 °C. Todas las muestras se probaron y se liberaron con pruebas que incluyeron ID (SDS PAGE), concentración de proteínas (BCA), agregación (SEC) y endotoxina.

En detalle, los FGF-21, recolectados después de la cromatografía IEX se agruparon, se determinaron las concentraciones de proteínas (BCA) y se concentraron mediante el uso de un filtro de centrifugación (Pall, NY, Estados Unidos, Dispositivos de centrifugación avanzados Macrosep®; o filtro de centrifugación MWCO 3K o Amicon Ultracel-3K) y se centrifugaron a 3220 x g durante aproximadamente 45 minutos, o hasta que la concentración de la fracción proteínica retenida alcanzó 1-2 mg/ml. El tampón de formulación para las proteínas FGF-21 no modificadas fue HEPES 20 mM, pH 6,8, NaCl 100 mM. Luego se añadió el tampón de formulación a la fracción retenida y la muestra se centrifugó como anteriormente hasta que la concentración de la fracción proteínica retenida fue de 1-2 mg/ml. Este proceso se repitió dos veces adicionales. Luego se añadió un tampón de formulación a la fracción retenida para llevar la concentración de la proteína a aproximadamente 1 mg/ml.

La formulación de todas las proteínas FGF-21 se realizó en un gabinete de Labconco, y se mantuvo un ambiente estéril. El filtro de jeringa Acrodisc® Mustang®-E de 0,2 μ m (PALL Corporation, NY, Estados Unidos) se trató previamente según las sugerencias del fabricante mediante el uso de 1 ml de agua estéril y sin endotoxinas, mediante la filtración a mano a un régimen de flujo de 1-4 ml/min a una velocidad controlada. Luego las soluciones se filtraron a través de los cartuchos Mustang® E con una jeringa a un régimen de flujo de 1-4 ml/min. El filtrado se mezcló suavemente y luego se dividió en alícuotas en viales de congelación sin pirógenos de 1,2 ml en los volúmenes deseados. Todos los productos se almacenaron congelados a -80 °C.

La contaminación por endotoxinas se determinó mediante el uso del ensayo del Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) (Genscript, Piscataway, NJ, Estados Unidos, Kit de ensayo cromogénico de endotoxinas LAL ToxinSensor™; núm. cat. L00350). La reacción LAL es un ensayo de punto final cuantitativo *in vitro* que usa un LAL modificado y un sustrato sintético productor de color para detectar endotoxinas en un ensayo cromogénico. La concentración de endotoxinas en una muestra se calculó a partir de su absorbancia en comparación con la absorbancia (405 nm) de soluciones que contenían cantidades conocidas de un estándar de endotoxinas.

La concentración de proteínas se determinó mediante el uso del kit de reactivos para el ensayo de proteínas Pierce Micro BCA™, parte núm. 23235 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Se usó BSA para preparar la curva estándar. Después de incubar a 37 °C durante 30 min, la placa se leyó en un lector de microplacas a

562 nm. La concentración de proteínas de la muestra se calcula con referencia a la curva estándar de la BSA. Las proteínas pegiladas no interfieren con este ensayo.

Se usó la columna Tosoh Biosciences (Tokio, Japón) (TSK Gel G3000SW XL, 7,8 mm x 30 cm, núm. de cat. S7165-06R), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), para determinar la pureza de las proteínas y la cantidad de agregados. La columna se equilibró con el tampón de procesamiento (50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8) y se inyectaron entre 20-50 µl de muestra (15-40 µg de proteína). El método usó un régimen de flujo de 0,5 ml/min y se monitoreó la absorbancia a A₂₈₀.

Todas las proteínas FGF-21 se compararon con la mezcla estándar de referencia de proteínas Bio-Rad (Bio-RAD, núm. de cat. 151-19010) que contiene tiroglobulina bovina (670 000), γ-globulina bovina (158 000), ovoalbúmina de pollo (44 000), mioglobina de caballo (17 000), vitamina B12 (1350). El estándar de referencia se inyectó (~25 µl) ya sea como una solución sin diluir o una solución diluida con el tampón de procesamiento.

Ejemplo 7: Producción de FGF21-GalNAc-SA-PEG-20/30 kDa mutante

El FGF21-GalNAc-SA-PEG-30 kDa mutante no está cubierto por el conjunto de reivindicaciones adjuntas. La glucosilación de cada mutante se evaluó mediante el uso de una reacción enzimática compuesta de la adición de MBP-GalNAcT2 y UDP-GalNAc y GalNAc, monitoreada por espectrometría de masas MALDI.

La glucopegilación de los FGF-21 mutantes se realizó en una única etapa, una reacción en un solo recipiente mediante el uso de MBP-GalNAcT2, ST6GalNAc1, UDP-GalNAc y CMP-SA-PEG-20/30 kDa (ya sea con PEG de 20 kDa o con PEG de 30 kDa). A los mutantes de FGF-21 purificados se les intercambiaron los tampones a tampón de reacción (Bis-Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 6,7) mediante el uso de un dispositivo de centrifugación avanzado Microsep® (Pall, NY, Estados Unidos, concentrador, núm. de cat. MAP003C37, 20 ml, MWCO 3K). Después del intercambio de tampón y la concentración, la concentración de la proteína mutante de FGF-21 estaba entre 3-5 mg/ml (BCA). Se disolvió el CMP-SA-PEG-20/30 kDa (equiv. a 3 mol) en la solución del mutante de FGF-21 (eq. a 1 mole). Se añadieron directamente al tubo de reacción MBP-GalNAcT2 (14-15 mU/mg de FGF-21), UDP-GalNAc (eq. a 1,1 mol), ST6GalNAc1 (100 mU/mg de FGF-21) y la solución de MnCl₂ (10 mM de concentración final), y se mezclaron suavemente. La concentración final de la proteína FGF-21 debe estar entre 2-4 mg/ml de mezcla de reacción. La mezcla de reacción se incubó a 32 °C durante toda la noche (~16 horas). Véase también los números de publicación del PCT: WO 2003/031464; WO 2005/089102; WO 2006/050247; y WO 2012/016984.

El producto FGF-21-GalNAc-SA-PEG-20/30 kDa mutante se purificó mediante el uso de cromatografía IEX (Source 15Q; columna de 1 cm x 24 cm) y el producto se eluyó con un gradiente de cloruro de sodio [tampón Tris 50 mM (pH 7,5), gradiente de cloruro de sodio de 0 a 100 mM sobre 20 volúmenes de columnas] a un régimen de flujo de 2 ml/min. Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE (4-12 %), se agruparon, se concentraron y se formularon. Todos los productos se analizaron en busca de contenido (BCA), pureza (SDS-PAGE), agregación (SEC) y endotoxinas.

Los rendimientos de conversión para este proceso fueron de entre 25 y 90 % según lo determinado por la SDS PAGE. Las mezclas de la reacción de pegilación se purificaron mediante el uso de cromatografía IEX (Source 15 Q). Cada producto pegilado se formuló y se realizaron las pruebas de liberación. Las pruebas de liberación incluyeron ID (SDS PAGE), concentración de proteínas (BCA), agregación (SEC) y endotoxinas. Cada producto pegilado tuvo una pureza superior al 98 %, sin agregados detectables. Los rendimientos aislados globales fueron del 15-44 % (mono-PEG) en base a la proteína FGF21 inicial.

Todos los mutantes de FGF-21 glucopegilados se formularon mediante el intercambio de tampón a las muestras mediante el uso de filtros de centrifugación, y luego se ajustó el volumen del tampón de formulación para proporcionar la concentración de proteína deseada de aproximadamente 1,0 mg/ml. Durante la concentración, nunca se permitió que la concentración de proteína superara los 5 mg/ml para evitar la agregación de proteínas. El tampón de formulación usado en este estudio fue fosfato de sodio (50 mM, pH 7,0), NaCl 100 mM. La eliminación de endotoxinas (Mustan E) y la filtración estéril se realizaron mediante el uso de una unidad de disco de filtro de eliminación de endotoxinas (filtro de 0,2 micras). Los viales se sellaron y se almacenaron a -80 °C. Se observó que los filtros Mustang® E reducen significativamente los rendimientos aislados globales del producto al unirse al FGF21.

Ejemplo 8: Técnica de imágenes por microscopía de flujo para el análisis de partículas subvisibles

Para evaluar el efecto de cuatro excipientes (sacarosa, polisorbato 20, EDTA y L-metionina) en los atributos de calidad del conjugado del FGF-21 mutante después del estrés repetitivo de congelación-descongelación y agitación, las muestras de conjugado se concentraron de aproximadamente 1,0 mg/ml a 36 mg/ml mediante ultrafiltración (UF) y se diluyeron a 25 mg/ml. Se prepararon once formulaciones de TEV- 47948 (Tabla 1), se llenaron con un volumen de llenado de 1,6 ml en viales de vidrio de 2 cc y se congelaron a -20 °C. Todas las formulaciones se sometieron a cuatro ciclos de estrés: descongelación a temperatura ambiente; agitación a 500 rpm durante 6 horas a temperatura ambiente y congelación a -20 °C. Después de la descongelación, las formulaciones se analizaron mediante la técnica de imágenes por microscopía de flujo (MFI), con el recuento de las partículas subvisibles ≥2 µm, ≥5 µm,

≥10 µm y ≥25 µm. Las partículas subvisibles se midieron mediante el uso del sistema MFI5200 de ProteinSimple (San José, CA) equipado con una celda de flujo de 100 µm. Las muestras, en alícuotas de 0,9 ml, se cargaron en una placa de 96 pocillos y se transfirieron a un muestreador automático Bot1. La optimización de la iluminación se realizó antes de cada muestra. Las muestras de TEV-47948 se analizaron por duplicado con un volumen de purga de 0,2 ml, un volumen por imagen de 0,6 ml, un régimen de flujo de 0,17 ml/min y una ampliación estándar de 5X. Antes del análisis, las muestras se homogenizaron en un pocillo mediante mezcla automática con una punta de pipeta. El filtro de imágenes implementado en el software del sistema de visualización MFI (MVSS) se usó para separar las imágenes de las burbujas de aire de las partículas de proteicas.

Tabla 1: Composición de las formulaciones del conjugado del péptido de FGF-21 mutante

Formulación	Conjugado del péptido mutante mg/ml	Tris/Tris·HCl, mM	NaCl, mM	Sacarosa, mM	PS20, mg/ml	NA ₂ H ₂ EDTA·2H ₂ O, mg/ml	L-Met, mg/ml
F1	26	16	56	0	0	0	0
F2	26	16	56	0	0	0,25	1,5
F3	26	16	56	0	0,3	0	1,5
F4	26	16	56	0	0,3	0,25	1,5
F5	26	16	56	0,075	0,15	0,125	0,75
F6	26	16	56	0,075	0,15	0,125	0,75
F7	26	16	56	0,075	0,15	0,125	0,75
F8	26	16	56	0,15	0	0	1,5
F9	26	16	56	0,15	0	0,25	0
F10	26	16	56	0,15	0,3	0	0
F11	26	16	56	0,15	0,3	0,25	1,5

Los resultados de la MFI muestran sustancialmente más partículas subvisibles en las formulaciones sin polisorbato 20 (F1, F2, F8, F9), es decir, el polisorbato 20 reduce la concentración de partículas subvisibles (Figura 7). Como resultado, se recomienda la siguiente composición de formulación del producto farmacéutico del conjugado del péptido de FGF-21 mutante para minimizar las partículas subvisibles mediante MFI: 26 mg/ml del conjugado del péptido de FGF-21 mutante, Tris 16 mM, NaCl 56 mM, sacarosa 0,15 M y 0,2 mg/ml de polisorbato 20; pH 7,5.

Ejemplo 9: Pruebas *in vitro* de mutantes de FGF-21 y conjugados glucopegilados

Los mutantes de FGF-21 y los conjugados de FGF-21 glucopegilados se cribaron en un ensayo celular que mide la captación de glucosa en adipocitos de ratón. El aumento de la captación de glucosa en los adipocitos de ratón a través del aumento de la expresión del transportador de glucosa, es una función notificada de FGF-21 (Kharitonov y otros, 2005, Journal of Clin Invest, 115(6):1627-1635). En este ensayo, la potencia de un compuesto de prueba se expresa como un valor de EC₅₀, que es la concentración del mutante o conjugado que dio una respuesta media máxima. Las muestras de prueba con una EC₅₀ inferior son más activas.

Para este propósito, los preadipocitos 3T3-L1 de ratón se diferenciaron durante 21 días en placas de 96 pocillos en preparación para las pruebas como se describió de manera similar (Kharitonov y otros, 2005, Journal of Clin Invest, 115(6):1627-1635). Se prepararon diluciones en serie de los mutantes de FGF-21 y conjugados glucopegilados y se añadieron a los adipocitos para una incubación de 72 horas. Durante las últimas 4 horas de la incubación, las células se cambiaron a medios que contenían una concentración reducida de glucosa y luego se marcaron con [³H]-2-desoxiglucosa (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) durante 1 hora. Las células se lavaron para detener la captación y eliminar la glucosa no incorporada. Los adipocitos se lisaron con NaOH 0,1 N y cóctel de centelleo (Ultima Gold™, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos). Se determinó la captación inespecífica de [³H]-2-desoxiglucosa en presencia de citocalasina 50 mM. Las placas se leyeron en un contador de LSC Microbeta® (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos).

La potencia de los mutantes de FGF-21 no glucopegilados se resume en la Tabla 2 y se evaluó para determinar si las mutaciones por sí solas afectaron la actividad de FGF-21. Los valores de potencia variaron de 0,4 - 4,3 nM, en comparación con la potencia de 2,0 nM para el FGF-21 de tipo salvaje. Estos datos demuestran que mutar la secuencia de FGF-21 en determinadas ubicaciones para crear el sitio consenso de glucosilación se toleró bien. Un valor de aproximadamente 30 nM o mayor se habría considerado inactivo.

Tabla 2: Evaluación de la potencia de los mutantes de FGF-21 mediante la captación de glucosa en adipocitos de ratón. La posición del residuo de prolina en la secuencia de aminoácidos de FGF-21 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 se da entre corchetes. ¹Cribado en un único ensayo.

Secuencia mutada	Valores de EC ₅₀ (nM) de la captación de glucosa en adipocitos de ratón diferenciados
	No glucopegilado ¹
P(148)TP	1,4
P (172)TQGAS	0,7
P(156)TP	2,2
M(1)FPTP	3,0
P(5)TSSP	3,4
P(5)TQAP	4,3
P(151)TINT	2,0
P(151)TTVS	2,4
P(125)TQA	0,4
P(125)TEI	0,8
P(3)TP	0,7
Tipo salvaje	2,0

La potencia de los conjugados del FGF-21 mutante glucopegilados varió de 9 nM a 20 nM (Tabla 3). Los análogos glucopegilados más potentes (EC₅₀ ~ 10 nM) demostraron menos potencia que el FGF21 de tipo salvaje (2 nM), lo que probablemente refleja algún obstáculo causado por la incorporación de la fracción voluminosa de PEG. Un intervalo de sitios de unión (desde cerca del extremo N-terminal hasta la prolina 172) sugiere que la adición del glucoPEG a cualquiera de los extremos de la molécula se toleró bien. Estos datos son consistentes con un informe que muestra que también se toleró un enfoque alternativo a la pegilación en el extremo N-terminal, como se evidenció por el aumento de la captación de glucosa en los adipocitos de ratón (Huang y otros, 2011, PLoS One, 6(6):e20669). Sin embargo, no se esperaba la observación de que la unión de la fracción de glucoPEG a los residuos cerca de la región C-terminal también se tolerara. Varios informes han demostrado que el extremo C-terminal del FGF-21 es necesario para la unión a β -Klotho, y la eliminación de los residuos de aminoácidos del lado C-terminal no se tolera bien para la unión y la potencia (Yie y otros, 2008, FEBS Letters, 583:19-24; Goetz y otros, 2012, Molecular and Cellular Biol, 32(10):1944-54).

Tabla 3: Evaluación de la potencia de los conjugados glucopegilados de FGF-21, pegilados con PEG de 30 kDa, mediante la captación de glucosa en adipocitos de ratón. La posición del residuo de prolina en la secuencia de aminoácidos de FGF-21 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 se da entre corchetes. ¹Los datos representan el promedio de entre 2 y 5 ensayos independientes.

Motivo de secuencia mutante	Valores de EC ₅₀ (nM) de la captación de glucosa en adipocitos de ratón diferenciados
	Glucopegilado ¹
P(148)TP	9
P (172)TQGAS	10
P(156)TP	10
M(1)FPTP	10
P(159)TINT	20

Inicialmente, solo se probaron los conjugados mutantes pegilados de 30 kDa (no cubiertos por el conjunto de reivindicaciones adjuntas), ya que se esperaba que esos fueran los candidatos más prometedores para un desarrollo adicional. Sin embargo, como se explica en la presente descripción anteriormente y más abajo, los conjugados mutantes con el PEG de 20 kDa exhibieron propiedades sorprendentes en base a los datos experimentales disponibles.

Ejemplo 10: Pruebas de los conjugados mutantes de FGF-21 glucopegilados de 20 kDa frente a los de 30 kDa en el ensayo de captación de glucosa de ratón y en el ensayo de fosforilación de las cinasas de células humanas reguladas por señales extracelulares (ERK)

Los mutantes del FGF-21 seleccionados se prepararon con una fracción de PEG de 20 kDa o 30 kDa y se probó su potencia en líneas celulares de ratón y humanas (Tabla 4). Los adipocitos 3T3-L1 de ratón se usaron para evaluar la potencia en un ensayo de captación de glucosa como se describe en el Ejemplo 9.

Para evaluar la actividad del conjugado mutante en una línea celular humana, las células embrionarias de riñón humano (HEK-293) se transfectaron transitoriamente con β -Klotho humano, el correceptor para FGF-21. La activación del receptor se evaluó mediante el uso de un ensayo para detectar la fosforilación de las cinasas relacionadas con señales extracelulares (ERK). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, se incubaron durante toda la noche y se aplicaron diluciones en serie de los conjugados mutantes de FGF-21 durante 20 minutos. Las células se lisaron y se midió la fosfo-ERK mediante ELISA (núm. de catálogo de R&D Systems DYC1018B; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, Estados Unidos). La fluorescencia resultante se leyó en un lector de microplacas Flexstation® (Dispositivos moleculares, Sunnyvale, CA, Estados Unidos).

Sorprendentemente, los conjugados que comprenden una fracción de PEG de 20 kDa fueron más activos que los conjugados de PEG de 30 kDa.

- 5 Adicionalmente, se observó que los dos ensayos usados eran sensibles a las modificaciones de manera diferencial. El conjugado P(5)TSSP que está glucopegilado cerca del extremo N-terminal mostró una actividad aceptable en el ensayo de fosfo-ERK humano, mientras que mostró una buena actividad en el ensayo de captación de glucosa de ratón. Sin embargo, los conjugados modificados cerca del extremo C-terminal mantuvieron una potencia muy alta tanto en líneas celulares humanas como de ratón (cf. datos de P(156)TP y P(172)TQGAS en la Tabla 3).

10 Tabla 4. Comparación de los conjugados mutantes de FGF-21 que comprenden fracciones de PEG de 20 kDa o 30 kDa. La posición del residuo de prolina en la secuencia de aminoácidos de FGF-21 de acuerdo con la secuencia del FGF-21 nativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 se da entre corchetes. ¹Las células HEK-293 expresaron transitoriamente el correceptor β -Klotho para FGF-21.

Motivo de la secuencia mutante	Valores de EC ₅₀ (nM) de la captación de glucosa en adipocitos de ratón diferenciados		Valores de EC ₅₀ (nM) de la fosforilación ERK en células HEK-293 que expresan ¹ β -Klotho	
	Tamaño del PEG (kDa)		Tamaño del PEG (kDa)	
	20	30	20	30
P(5)TSSP	33	71	293	>3000
P(156)TP	38	38	109	188
P (172)TQGAS	47	54	86	177

15 Ejemplo 11: Prueba *in vivo* de los conjugados del Ejemplo 10 con las fracciones de PEG de 20 kDa y 30kDa.

Los conjugados del Ejemplo 10, cada uno con una fracción de PEG de 20 kDa o 30 kDa, se eligieron para una investigación más detallada *in vivo* (los resultados se dan en la Tabla 4). Los conjugados seleccionados tuvieron una buena actividad en los ensayos celulares *in vitro* y se expresaron en cantidades adecuadas para las pruebas *in vivo*.

Como criterios para identificar los conjugados más potentes se usaron la extensión de la semivida y la exposición farmacocinética (PK) en ratas Sprague Dawley normales y la eficacia en el modelo de ratón diabético db/db.

25 Para determinar la extensión PK de la semivida en ratas Sprague Dawley, los conjugados de FGF-21 se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato estéril y se administraron por vía subcutánea a ratas Sprague Dawley machos (~0,3 kg) a 0,25 mg/kg. Se extrajo sangre de la vena lateral de la cola 1, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 78 y 96 horas después de la administración. Las muestras de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se centrifugaron para separar el suero. La fracción de suero se transfirió a tubos limpios, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Los conjugados de FGF-21 se detectaron en suero mediante ELISA de acuerdo con las orientaciones del fabricante (BioVendor, Brno, República Checa, ELISA de FGF-21 humano, núm. de cat. RD191108200R), excepto que cada conjugado se usó para preparar la curva estándar. Los parámetros farmacocinéticos compuestos se estimaron mediante un análisis no compartimental de la concentración en suero frente a los datos de tiempo mediante el uso del software WinNonlin (Versión profesional 5.2, Pharsight Corporation, Palo Alto, CA, Estados Unidos).

La semivida circulante de los conjugados glucopegilados se extendió (intervalo de 15-30 horas) en comparación con el FGF-21 de tipo salvaje (2 horas). Tanto la pegilación de 20 kDa como la de 30 kDa tuvieron un impacto similar en la semivida y la exposición del conjugado, lo que demostró el valor de la pegilación para la extensión de la semivida del FGF-21.

Tabla 5. Eficacia *in vivo* de los conjugados de FGF-21 glucopegilados. La posición del residuo de prolina en la secuencia de aminoácidos de FGF-21 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 se da entre corchetes. PK = farmacocinética, WT = de tipo salvaje, AUC = área bajo la curva. ¹Las ratas Sprague Dawley recibieron una dosis por vía subcutánea con 0,25 mg/kg de cada conjugado o del FGF-21 de tipo salvaje. ²Intervalo de dosis que mostró una mejora significativa para cada parámetro. Se administró una dosis de los conjugados en los días 1 y 4, y los datos se recogieron en el día 6. ³Se administró una dosis del FGF-21 diariamente a 3 mg/kg durante 14 días. ⁴Los datos estaban en tendencia, pero no alcanzaron significación mediante el ANOVA.

Tamaño del conjugado-PEG	PK <i>in vivo</i> ¹		Intervalo de eficacia <i>in vivo</i> (mg/kg) ²		
	Semivida (horas)	AUC (mg*h/ml)	Glucemia	Triglicéridos	Insulina
P (172)TQGAS-20	22 ± 3	35 ± 1	0,125 - 2,5	0,125 -0,25	2,5
P (172)TQGAS-30	21 ± 2	42 ± 5	0,125 - 5	5	>5 ⁴
P(156)TP-20	15 ± 1	25 ± 1	0,25 - 2,5	0,125 - 2,5	>2,5
P(156)TP-30	18 ± 1	30 ± 4	0,125 - 4	1	2,5 - 4
P(5)TSSP-20	24 ± 0,4	24 ± 1	2,5	1	>2,5

P(5)TSSP-30	30 ± 1	17 ± 1	4	>4	>4
FGF-21 WT	2 ± 0,2	0,3 ± 0,01	3 ³	>3	>3

El ratón diabético db/db es un modelo genético con una mutación en el receptor de leptina que resulta en una glucemia alta y dislipidemia. La determinación de los efectos farmacodinámicos en el modelo de ratón db/db se realizó en HD Biosciences (Shanghai, China). Ratones machos *db/db* (BKS.Cg-Dock7^m *+/+* *Lepr^{db}/J*) y camadas emparejadas por edad (control no diabético) se compraron en el Centro de Investigación de Modelos Animales de la Universidad de Nanjing, China. Los animales se aclimataron durante una semana después de su llegada en una condición estándar con temperatura ambiente a 21-23 °C, 30-70 % de humedad relativa y un ciclo de luz: oscuridad de 12h:12h. La dieta y el agua estaban disponibles *ad libitum*. El comité institucional de cuidado y uso de animales (IACUC) en HD Biosciences aprobó todos los procedimientos experimentales. Para el cribado de los conjugados, los ratones recibieron una dosis de 0, 0,125, 0,25, 1, 2,5 mg/kg en los días 1 y 4. La glucemia se determinó durante el estudio mediante el uso de un glucómetro. En el día 6, se sacrificaron los animales y se evaluaron los niveles de triglicéridos séricos (ensayo EnzyChromTM, núm. de cat. ETGA-200, Bioassay Systems, Hayward, CA, Estados Unidos) y de insulina sérica (Kit de insulina de ratón, MesoScale Discovery, Rockville, MD, Estados Unidos).

Los conjugados glucopegilados se examinaron en ratones db/db para determinar sus efectos sobre la glucemia, los niveles de triglicéridos séricos y de insulina sérica (Tabla 5). Las dosis que mejoraron significativamente estos parámetros se muestran en la Tabla 5. Mientras que los conjugados glucopegilados de 20 kDa y 30 kDa fueron eficaces de manera similar en cuanto a la reducción de los niveles de glucemia, los conjugados pegilados de 20 kDa generalmente superaron a los conjugados de 30 kDa al mejorar los triglicéridos a dosis más bajas y a través de intervalos de dosis más amplios.

La Tabla 6 más abajo demuestra que el conjugado de 20 kDa de cada mutante disminuyó los niveles de triglicéridos en mayor medida que el conjugado de 30 kDa cuando se comparó cada conjunto de datos con su grupo de control de vehículos, cuyo valor se considera que es del 100 % (por ende, cuanto más bajos son los resultados, mejor es el rendimiento).

Tabla 6. Disminución de los triglicéridos (% del control de vehículo). Se administró una dosis de 0,125 mg/kg en los días 1 y 4, se determinaron los triglicéridos el día 6.

	PEG de 20 kDa	PEG de 30 kDa
P (172) TQGAS	69 ± 16	72 ± 35
P(156) TP	66 ± 20	117 ± 37
P(5) TSSP	86 ± 33	96 ± 15

Los niveles de insulina sérica se alteraron a través de un amplio intervalo mediante la administración de los conjugados de FGF-21 glucopegilados (Tabla 7). Se previó que, a medida que los conjugados de FGF-21 mejoraban la resistencia a la insulina, se resolvería la hiperinsulinemia en suero. Todos los ratones db/db mostraron una hiperinsulinemia significativa en comparación con los controles de la camada no diabéticos. La administración de P(172)-20 resultó en la mayor reducción de la insulina, con una disminución del 73 % a 2,5 mg/kg. Además, P(172)-20 demostró una tendencia hacia una disminución de la insulina sérica a dosis de 0,25 - 1,0 mg/kg.

Tabla 7. Reducción de los niveles de insulina sérica para los conjugados glucopegilados en el modelo de ratón db/db. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 según lo determinado mediante el ANOVA unidireccional

	Niveles de insulina sérica (ng/ml) para conjugados de PEG 20 kDa-FGF-21		
Dosis (mg/kg)	P(172)-20	P(156)-20	P(5)TSSP-20
No diabético	0,4 ± 0,1***	0,4 ± 0,1*	0,4 ± 0,1**
db/db + vehículo	5,6 ± 1,0	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5
0,125	6,0 ± 0,6	9,3 ± 1,1***	3,5 ± 0,5
0,25	3,9 ± 0,7	4,8 ± 0,8	4,5 ± 0,4
1	3,8 ± 0,6	3,7 ± 0,7	6,1 ± 0,7*
2,5	1,5 ± 0,1***	3,1 ± 0,7	5,6 ± 0,7

En resumen, todos los mutantes y conjugados mutantes se expresaron en cantidades adecuadas y son biológicamente activos. Los conjugados de PEG-20 kDa mostraron un mejor rendimiento en los ensayos *in vitro* de captación de glucosa y fosforilación ERK y en los experimentos *in vivo* mientras que la semivida mejoró de manera similar en las especies de conjugados mutantes de PEG-20 kDa y PEG 30 kDa. Por ende, dado que aparentemente no se logra un aumento adicional de la semivida cuando se une un residuo de PEG de 30 kDa más grande en contraste con un residuo de PEG de 20 kDa más pequeño a un FGF-21 mutante, es beneficioso unir el PEG de 20 kDa más pequeño, ya que es menos probable que los residuos de PEG más pequeños creen un obstáculo para la unión al receptor, o se espere que ocurra un encubrimiento de las partes de la proteína mutante de FGF-21, las que se requieren para la interacción biológica natural, (lo que conduciría a una actividad biológica reducida). Además, los conjugados pegilados de 20 kDa generalmente superaron a los conjugados a 30 kDa mediante la

mejora de los triglicéridos a dosis más bajas y a través de intervalos de dosis más amplios.

Ejemplo 12: Eficacia de la administración de múltiples dosis de PEG 20 kDa-FGF-21 P(172)TQGAS (en este Ejemplo 12 denominado "conjugado del péptido de FGF-21 mutante") a monos cynomolgus diabéticos

Los monos cynomolgus (intervalo de edades de 6-28 años de edad) se aleatorizaron en grupos (n=6) al comienzo del experimento en base a sus niveles endógenos de FGF21. El nivel promedio en suero de FGF-21 entre los grupos varió de 229 ± 58 pg/ml a 312 ± 88 pg/ml. Después de una fase de aclimatación y una fase de recolección inicial de 2 semanas, los grupos de monos recibieron una dosis de vehículo, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg o 1 mg/kg del conjugado del péptido de FGF-21 mutante, s.c., una vez por semana durante un curso de 8 semanas. Los monos se evaluaron durante 10 semanas más durante la fase de reposo farmacológico del estudio. Los criterios de valoración del estudio incluyeron el peso corporal, el consumo de alimentos, la glucemia en ayunas, el nivel de HbA1c, la ALT y los lípidos séricos.

12.1 Efecto del conjugado del péptido de FGF-21 mutante sobre el peso corporal y la ingestión de alimentos

Los monos cynomolgus diabéticos demostraron una ingestión reducida de alimentos en todos los niveles de dosis (Tabla 8). Sin embargo, solo los animales tratados con la dosis más alta del conjugado del péptido de FGF-21 mutante (1,0 mg/kg) mostraron una reducción significativa en el porcentaje de peso corporal, con el efecto máximo de aproximadamente 10 % al final de la fase de tratamiento (Tabla 8). Los efectos no se estabilizaron antes de que finalizara el tratamiento, y los animales recuperaron sus pesos corporales hasta los niveles iniciales alrededor de 4 semanas después del último tratamiento (datos no mostrados).

Tabla 8: Efecto del conjugado del péptido de FGF-21 mutante sobre el peso corporal y la ingestión de alimentos en monos cynomolgus diabéticos

Parámetro	Día en la prueba	Vehículo	Conjugado mutante de FGF-21 (mg/kg) s.c.		
			0,1	0,3	1,0
Peso corporal (kg)	0	8,2 (1,3)	9,4 (0,7)	10,1 (1,7)	8,0 (0,8)
	56	8,1 (1,3)	9,3 (0,8)	9,8 (1,7)	7,2(0,8)
Media (SEM)	% de cambio a partir de los valores iniciales	-1,2 %	-1,1 %	-3,0 %	-10,0 % ^a
Media (SEM) de la ingestión de alimentos (g)	0	185 (22)	214 (24)	201 (22)	223(25)
	56	188 (20)	160 (28)	141 (15)	126 (36)
	% de cambio a partir de los valores iniciales	1,8 %	-25,4% ^a	-29,7% ^a	-43,7% ^a

^ap<0,05; kg = kilogramo; SEM= error estándar de la media

12.2 Efecto del conjugado del péptido de FGF-21 mutante sobre el control glucémico en monos cynomolgus diabéticos

La eficacia del conjugado del péptido de FGF-21 mutante se evaluó en varios parámetros de control glucémico que incluyen la glucemia en ayunas, hemoglobina glucosilada A1c (HbA1c), niveles de insulina en suero y tolerancia en una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT). Los informes previos han sugerido que los análogos del FGF-21 puede que no afecten el control glucémico en los NHP o en seres humanos (Talakdar y otros, 2016, Gaich y otros, 2014). La administración del análogo de FGF-21 de acción corta LY2405319 a diabéticos de tipo 2 obesos demostró una reducción del peso corporal, la insulina y los triglicéridos, pero no redujo significativamente la glucemia (Gaich y otros, 2014). De manera similar, el análogo de FGF-21 de acción prolongada PF-05231023 redujo el peso corporal y los triglicéridos, pero no mostró ningún efecto sobre la tolerancia a la glucosa en monos cynomolgus obesos (Talakdar y otros, 2016). No se observó ningún cambio en los niveles de glucosa e insulina en ayunas en pacientes diabéticos de tipo 2 (Talakdar y otros, 2016). Los investigadores evaluaron la eficacia de un estudio clínico de 12 semanas de BMS-986036 (Bristol-Myers Squibb) en 120 pacientes con diabetes tipo 2. Los pacientes que recibieron BMS-986036 mostraron una mejora del propéptido N-terminal de colágeno tipo III, pero no mostraron mejoras en la HbA1c o el peso corporal (Charles ED, y otros Resumen 33. Presentado en: The Liver Meeting; 11-15 de noviembre de 2016; Boston; Charles ED, y otros Resumen 1082. Presentado en: The Liver Meeting; 11-15 de noviembre de 2016; Boston).

La administración semanal del conjugado del péptido de FGF-21 mutante probado a monos diabéticos mejoró los niveles de glucemia en ayunas de una manera dependiente de la dosis (Tabla 9). Los niveles de insulina fueron variables entre los grupos al comienzo del estudio, pero se observaron disminuciones significativas, en comparación con los valores iniciales, a la dosis más alta (Tabla 9).

Consistente con el cambio en la glucemia en ayunas fue la mejora concomitante en los niveles de HbA1c (Figura 8), que es un índice confiable para evaluar los niveles de glucemia en el tiempo. Es notable que la mejora de la HbA1c no se ha informado para ningún otro análogo o mutante de FGF-21 en la técnica hasta la fecha. En particular, no se ha informado de la mejora de la HbA1c para los productos candidatos basados en el FGF-21, específicamente BMS-986036 de BMS o PF-05231023 de Pfizer o LY2405319 de Lilly.

Tabla 9: Efecto del conjugado del péptido de FGF-21 mutante sobre la glucemia en ayunas en monos cynomolgus diabéticos ^ap<0,05, ^bp<0,01; kg = kilogramo; mIU = mili unidades internacionales; SEM= error estándar de la media

Parámetro	Día en la prueba	Vehículo	Conjugado mutante de FGF-21 (mg/kg) s.c.		
			0,1	0,3	1,0
Media (SEM) de la glucemia (mg/dl)	0	210 (42)	201 (37)	197 (37)	250 (18)
	56	246 (46)	141 (30)	120 (19)	115 (16)
	% de cambio a partir de los valores iniciales	16,7% ^a	-29,9 % ^a	-39,4 % ^a	-53,9 % ^b
Media (SEM) de insulina sérica (mIU/l)	0	78 (33)	124 (76)	137 (64)	51 (10)
	56	66 (18)	55 (27)	53 (18)	15 (3)
	% de cambio a partir de los valores iniciales	-16 %	-56 %	-61 %	-72 % ^a

Se recolectaron muestras de sangre (1,0 ml/por tiempo) de la vena cefálica o safena en tubos BD Vacutainer® K2-EDTA en los puntos temporales indicados. Las muestras se almacenaron inmediatamente en una nevera a 4 °C o con hielo común. Las muestras se analizaron el mismo día en que se recolectó la sangre.

El valor de HbA1c se midió con HPLC mediante el uso del sistema de prueba de glucohemoglobina (BIO-RAD, Hercules, CA, Estados Unidos).

La OGTT se realizó en el día -11 (valor inicial) y en los días 31 y 52 después de la administración de la dosis (Figura 9). El conjugado del péptido de FGF-21 mutante mejoró la tolerancia a la glucosa oral en ambos días 31 y 52 y en todas las dosis probadas. Parece que el efecto máximo del conjugado del péptido de FGF-21 mutante sobre la tolerancia a la glucosa se alcanzó sorprendentemente en el día 31 y a la dosis más baja, ya que las diferencias en la tolerancia a la glucosa dentro de cada grupo de tratamiento en los días 31 y 52 fueron similares. Se han observado efectos divergentes de los análogos de FGF21 en la OGTT en NHP y pueden reflejar variaciones en la farmacología de los análogos de FGF21. No se observaron mejoras en la OGTT para un FGF21 de acción prolongada en el cynomolgus obeso (Talakdar y otros, 2016), sino que se notificaron para un análogo del FGF21 de acción prolongada en el mono rhesus obeso (Murielle M. Véniant, Renee Komorowski, Ping Chen, Shanaka Stanislaus, Katherine Winters, Todd Hager, Lei Zhou, Russell Wada, Randy Hecht, y Jing Xu (2012) Endocrinology 153:4192-4203).

La glucosa se administró a los animales mediante la colocación de 1,0 g/kg de glucosa + 10 g/kg de plátano: la glucosa se enterró en medio del plátano y luego se alimentó a los animales. La sangre se obtuvo a través de una punción de la vena de la cola para la medición de la glucemia mediante un glucómetro (ACCU-CHEK® Performa, Roche). Los datos se muestran como el área bajo la curva (AUC) para cada tratamiento. *p<0,05, **p<0,01 (Figura 9).

12.3 Niveles de ALT en suero en monos cynomolgus diabéticos tratados con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante

Los niveles de ALT en suero se midieron semanalmente durante el curso del estudio. Los niveles de ALT se redujeron en los grupos de las dosis de 0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg en los días 7 y 14, respectivamente. Se observó una tendencia a niveles reducidos de ALT hasta el día 14 para el grupo de la dosis de 0,3 mg/kg (p = 0,056) y hasta el día 28 en el grupo de 1,0 mg/kg (p = 0,073). Por el contrario, la concentración de ALT aumentó modestamente en el grupo vehículo al final del período de tratamiento (Figura 10).

Los parámetros de la química del suero (TG, TC, HDL, LDL, ALT, glucosa) se midieron mediante el uso del sistema ADVIA® R2400 (SIEMENS).

12.4 Concentraciones de lípidos séricos en monos cynomolgus diabéticos tratados con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante

Los niveles de lípidos séricos (triglicérido (TG), colesterol total (TC), colesterol de alta densidad (HDL) y colesterol de baja densidad (LDL) se midieron semanalmente durante el curso del estudio. El tratamiento de los animales con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante durante 4 días condujo a una disminución dramática de los niveles de TG séricos a todas las dosis probadas, los que permanecieron estables durante la duración de la fase de tratamiento.

Los niveles de TG séricos se recuperaron durante la fase de reposo farmacológico hasta sus niveles iniciales (Figura 11). Por el contrario, solo se observó un aumento insignificante de los niveles de TG en los animales tratados con el vehículo.

5 Los niveles de TG se normalizaron a los valores iniciales para cada individuo (Figura 11). Los parámetros de la química del suero (TG, TC, HDL, LDL, ALT, glucosa) se midieron mediante el uso del sistema ADVIA® R2400 (SIEMENS).

10 Los niveles de colesterol total y el colesterol LDL se redujeron modestamente en un 29 y un 39 por ciento, respectivamente, a la dosis más alta del conjugado del péptido de FGF-21 mutante. Los niveles de colesterol HDL se elevaron significativamente con el tratamiento con el péptido de FGF-21 mutante y volvieron a los valores iniciales durante la fase de reposo farmacológico (Figura 12).

15 Los parámetros de la química del suero (TC, HDL, LDL) se midieron mediante el uso del sistema ADVIA® R4200 (SIEMENS). Los niveles de colesterol HDL se normalizaron a los valores iniciales para cada individuo.

12.5 Evaluación del biomarcador adiponectina en monos cynomolgus diabéticos tratados con el conjugado del péptido de FGF-21 péptido mutante

20 Hubo una tendencia a elevaciones de los niveles de adiponectina de alto peso molecular (HMW) en los grupos de 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg y se elevaron significativamente en el grupo de dosis de 1,0 mg/kg para el día 21 (Figura 13).

La adiponectina en el suero de los monos se detectó mediante el uso de un kit comercial para el Inmunoensayo de la adiponectina/Acrp30 HMW humana núm. de catálogo DHWAD0 (R&D Systems).

25 Ejemplo 13: Eficacia de la administración de PEG 20 kDa-FGF-21 P(172)TQGAS (en este Ejemplo 13 denominado "TEV-47948") en un modelo de ratón de esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

13.1 Eficacia en un modelo de ratón de esteatohepatitis no alcohólica (NASH)

30 El modelo animal de ratón de Stelic (STAM) desarrolla NASH, fibrosis y finalmente carcinoma hepatocelular. Este modelo demuestra una progresión patológica muy similar a la enfermedad humana; en particular, los ratones STAM manifiestan NASH a las 8 semanas, que progresa a la fibrosis a las 12 semanas, y finalmente desarrollan carcinoma hepatocelular (Saito y otros, 2015). El conjugado del péptido de FGF-21 mutante se evaluó en ratones STAM y se evaluó su efecto sobre el peso corporal, la relación entre el peso hepático y el peso corporal, la esteatosis hepática, la inflamación, la fibrosis y la puntuación de Actividad de NAFLD (NAS) compuesta.

35 La NASH se indujo en 40 ratones machos C57BL/6 mediante una única inyección subcutánea de 200 mg de estreptozocina (STZ, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 2 días después del nacimiento y una alimentación con dieta rica en grasa (HFD, % grasa 57 kcal, núm. de cat.: HFD32, CLEA Japón, Japón) después de 4 semanas de edad. Los ratones se aleatorizaron en 5 grupos de 8 ratones a las 6 semanas de edad. Como vehículo se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se usaron ocho ratones machos, alimentados con dieta normal y sin tratamiento con STZ, para el grupo Normal. El conjugado del péptido de FGF-21 mutante se administró una vez cada 72 horas, s.c., a partir de las 6-9 semanas de edad a dosis de 0,1, 0,5, 2,0 y 6,0 mg/kg.

45 El conjugado del péptido de FGF-21 mutante mejoró significativamente el peso hepático y la relación entre el peso hepático y el peso corporal durante el curso del estudio (Tabla 10). El peso corporal medio, el peso hepático y la relación entre el peso hepático y corporal en el día del sacrificio disminuyeron significativamente en los grupos que recibieron el conjugado del péptido de FGF-21 mutante a 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg y 6,0 mg/kg, en comparación con el grupo del vehículo.

50 Tabla 10: Peso corporal y hepático en el modelo STAM después del tratamiento con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante. Los datos mostrados son el promedio $\pm$ desviación estándar para cada grupo (n = 8 animales por grupo) al final del estudio. 1 = p<0,001 en comparación con el grupo del vehículo; 2 = p<0,05 en comparación con el grupo del vehículo; 3 = p<0,01 en comparación con el grupo del vehículo.

Parámetro	Normal	Vehículo	dosis del péptido de FGF-21 mutante (mg/kg)			
			0,1	0,5	2,0	6,0
Peso corporal (g)	22,6 $\pm$ 0,9	20,3 $\pm$ 0,9	19,0 $\pm$ 1,7	17,5 $\pm$ 1,9 ¹	15,8 $\pm$ 0,9 ¹	14,5 $\pm$ 1,2 ¹
Peso hepático (mg)	1013 $\pm$ 95	1310 $\pm$ 179	992 $\pm$ 193 ¹	892 $\pm$ 151 ¹	753 $\pm$ 182 ¹	632 $\pm$ 109 ¹
Relación peso hepático a peso corporal (%)			dosis del péptido de FGF-21 mutante (mg/kg)			
			0,1	0,5	2,0	6,0
	4,5 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 1,0	5,3 $\pm$ 1,4	5,1 $\pm$ 0,7 ²	4,8 $\pm$ 1,0 ³	4,4 $\pm$ 0,5 ¹

El conjugado del péptido de FGF-21 mutante mejoró los parámetros bioquímicos en el modelo STAM (Tabla 11). En los días 7 y 16, los niveles de glucemia sin estar en ayunas aumentaron significativamente en el grupo del vehículo en comparación con el grupo Normal. En el día 16, los niveles de glucemia sin estar en ayunas disminuyeron significativamente en el grupo que recibió el conjugado del péptido de FGF-21 mutante a -6,0 mg/kg en comparación con el grupo del Vehículo. En el día 22, los niveles de glucemia en ayunas disminuyeron significativamente en el grupo que recibió el conjugado del péptido de FGF-21 mutante a -6,0 mg/kg y tendieron a disminuir en los grupos que recibieron el conjugado del péptido de FGF-21 mutante a -0,1 mg/kg y -2,0 mg/kg en comparación con el grupo del Vehículo. No hubo ninguna diferencia significativa en los niveles de glucemia en el ayuno de 4 horas, entre el grupo del Vehículo y el grupo que recibió el conjugado del péptido de FGF-21 mutante a -0,5 mg/kg.

Los niveles en suero de alanina aminotransferasa (ALT) sirven como un marcador de daño hepático y aumentaron significativamente en el grupo del vehículo en comparación con el grupo Normal en el modelo STAM. Los niveles en suero de ALT disminuyeron significativamente en los grupos que recibieron el conjugado del péptido de FGF-21 mutante a -2,0 mg/kg y -6,0 mg/kg y tendieron a disminuir en el grupo que recibió el conjugado del péptido de FGF-21 mutante a -0,5 mg/kg en comparación con el grupo del Vehículo. No hubo ninguna diferencia significativa en los niveles en suero de ALT entre el grupo del Vehículo y el grupo que recibió el conjugado del péptido de FGF-21 mutante a 0,1 mg/kg.

Tabla 11: Parámetros bioquímicos en el modelo STAM después del tratamiento con el conjugado del péptido de FGF-21 mutante. Los datos mostrados son el promedio $\pm$ desviación estándar para cada grupo (n = 8 animales por grupo) al final del estudio. ALT = alanina aminotransferasa en suero. AST=aspartato aminotransferasa. 1= p<0,05 en comparación con el grupo del vehículo; 2= p<0,01 en comparación con el grupo del vehículo.

			dosis del conjugado del péptido de FGF-21 mutante (mg/kg)			
Parámetro	Normal	Vehículo	0,1	0,5	2,0	6,0
Glucemia (día 7, mg/dl)	164 $\pm$ 25	346 $\pm$ 124 ²	265 $\pm$ 76	351 $\pm$ 127	334 $\pm$ 119	274 $\pm$ 133
Glucemia (día 16, mg/dl)	165 $\pm$ 26	376 $\pm$ 107 ²	371 $\pm$ 82	388 $\pm$ 139	342 $\pm$ 164	220 $\pm$ 113 ¹
			dosis del conjugado del péptido de FGF-21 mutante (mg/kg)			
Glucemia en ayunas (día 22, mg/dl)	193 $\pm$ 19	409 $\pm$ 722	274 $\pm$ 90	333 $\pm$ 157	284 $\pm$ 172	204 $\pm$ 692
ALT (U/l)	20 $\pm$ 2	225 $\pm$ 193 ²	153 $\pm$ 160	85 $\pm$ 60	56 $\pm$ 43 ¹	58 $\pm$ 45 ¹
AST (U/l)	68 $\pm$ 26	295 $\pm$ 149 ²	252 $\pm$ 166	238 $\pm$ 101	225 $\pm$ 84	239 $\pm$ 58
Triglicéridos hepáticos (mg/g de hígado)	15,8 $\pm$ 8,9	25,8 $\pm$ 9,9	15,1 $\pm$ 8,0	12,6 $\pm$ 7,3 ¹	12,9 $\pm$ 14,4 ¹	8,3 $\pm$ 4,1 ²

La puntuación de actividad de NAFLD (NAS) es una medición de la esteatosis (tinción con rojo aceite O), la dilatación de los hepatocitos apoptóticos (tinción HE) y la inflamación (tinción por inmunoensayo F4/80) y se desarrolló como una herramienta para medir los cambios en la NAFLD durante estudios clínicos terapéuticos. Las secciones hepáticas del grupo del Vehículo en el presente estudio exhibieron un depósito de microvesículas y macrovesículas de grasa grave, dilatación hepatocelular e infiltración de células inflamatorias. Consistente con estas observaciones, el NAS aumentó significativamente en el grupo del vehículo en comparación con el grupo Normal. Todas las dosis del grupo de TEV-47948 mostraron mejoras marcadas en la esteatosis, la dilatación hepatocelular y la infiltración de células inflamatorias, con una reducción significativa en el NAS en comparación con el grupo del vehículo (Figura 14).

13.2. Eficacia en el modelo de ratón de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) DIN (NASH inducido por dieta)

En un modelo animal alternativo, el modelo DIN induce la NASH mediante el uso de cambios en la dieta como se entiende en la técnica y se describe a más abajo. El modelo de NASH DIN es un modelo animal aceptado de diabetes tipo II. Por lo tanto, difiere del modelo de NASH STAM descrito anteriormente en el que la NASH se indujo en ratones mediante una inyección de estreptozocina, seguido de una dieta rica en grasa (STAM NASH). El NASH STAM es un animal aceptado de diabetes tipo I.

En el modelo DIN descrito en este ejemplo, la fase de aclimatación comprende una dieta estándar (RM1 (E) 801492, SDS) y agua potable normal, que se proporcionó ad libitum.

Los ratones se alimentaron con una dieta rica en grasa 60 % / 2 % de colesterol (Dietas de investigación

Inc., NJ, Estados Unidos) y fructosa al 10 % en agua potable (dieta DIN). El contenido de grasa de la dieta es del 60 % de kcal a partir de la grasa. Sobre una base de % en g, la grasa representa el 35 % en g, con el 3 % en g del aceite de soja y el 32 % en g de manteca de cerdo

Métodos:

Después del período de aclimatación, los ratones recibieron la dieta DIN durante 25 semanas. El peso corporal de los ratones se midió semanalmente hasta el final del período de dieta de 25 semanas. A las 6 semanas del período de dieta, se pesaron los ratones y se sometieron a un ayuno de 4 horas (10 % de fructosa sustituido por agua normal) a las 09:00 AM. Luego se recolectó la sangre a las 1:00 PM para medir la glucemia y la insulina plasmática, así como también los niveles de ALT y AST en plasma. El HOMA-IR se calculó a partir de los valores de glucemia e insulina plasmática. Se excluyeron 15 ratones con los valores más bajos de HOMA-IR y ALT/AST. Los ratones se dividieron en 5 grupos homogéneos de acuerdo con su HOMA-IR, ALT/AST y peso corporal y se trataron con el vehículo o 3 dosis diferentes de inyecciones de TEV-47498 s.c. cada 3 días. El OCA se dio en la dieta.

A las 6, 10, 15 y 19 semanas de tratamiento, los ratones se sometieron a un ayuno de 4 horas (10 % de fructosa reemplazada por agua normal) a las 9:00 AM y se recolectó la sangre para medir la glucemia, la insulina en plasma, la ALT y la AST, los niveles de colesterol total y triglicéridos. En la semana 19 del tratamiento, a todos los ratones se les extrajo sangre (~100 µl de sangre) en 4 puntos temporales diferentes (0, 6, 24, 48 h) después de la última dosis para aislar el suero que se almacenó a -80 °C antes del envío en hielo seco para su análisis. A 5 ratones por grupo se les extrajo sangre a las 0 h y 24 h y a los otros 5 se les extrajo la sangre a las 6 h y 48 h después de la administración de la dosis. Después de la última recolección de sangre, los ratones se sacrificaron por luxación cervical bajo anestesia isoflurano al 4 % y se desangraron con solución salina estéril.

Resultados:

En este estudio, el efecto de TE-47948 se evaluó en el modelo de ratón DIN como se describió en la presente descripción anteriormente, con los siguientes detalles. Después de 6 semanas de una dieta que induce la NASH, un subgrupo de ratones C57B16 se trató con TE-47948 a tres dosis diferentes (20 µg/kg, 100 µg/kg y 500 µg/kg) mediante administración subcutánea, cada 3 días durante 19 semanas. Para comparar la eficiencia de TE-47948 en la progresión de la NASH en relación con los controles relativos, un subgrupo de ratones C57B16 inducidos para tener NASH, se trató con control de vehículo y un subgrupo de ratones C57B16 inducidos para tener NASH se trató con el agonista del FXR, el ácido obeticolico (OCA), que se añadió a la dieta (25 mg/kg), y estos subgrupos se evaluaron en paralelo. El OCA se usó como referencia por sus propiedades contra la NASH.

El TEV-47948 redujo significativamente el daño hepático inducido en el modelo de ratón DIN de una manera dependiente de la dosis. Esta observación se evidenció mediante una reducción significativa de la puntuación NAS histológica, así como también por una reducción importante de las aminotransferasas hepáticas, los lípidos hepáticos y los marcadores inflamatorios y de fibrosis. Véanse, por ejemplo, las Figuras 15 y 16.

Además de los efectos beneficiosos sobre el hígado, el TE-47948 reveló además propiedades significativas contra la diabetes y la obesidad. Véanse, por ejemplo, las Figuras 17-20.

En conjunto, estas observaciones confirmaron los efectos beneficiosos del TE-47948 en el tratamiento de la NASH inducida por la dieta.

Ejemplo 14: Diferentes pautas terapéuticas y sus efectos sobre la eficacia de la administración de PEG 20 kDa-FGF-21 P(172)TQGAS (en este Ejemplo 14 denominado "glucol-PEG-FGF-21") a los monos cynomolgus diabéticos

El objetivo de este ejemplo es investigar los efectos farmacológicos del gluco-PEG-FGF21 y su exposición sistémica en monos cynomolgus diabéticos espontáneos, cuando se administran mediante el uso de diferentes pautas terapéuticas. Más particularmente, los experimentos se dirigen a examinar los efectos farmacológicos del gluco-PEG-FGF21 cuando se administra una vez a la semana o una vez cada 2 semanas mediante inyección subcutánea.

Diseño experimental

14.1 Alojamiento de los animales

Los monos diabéticos espontáneos se alojan y mantienen de acuerdo con las directrices aprobadas por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Las condiciones que deben lograrse en el entorno de vida del animal y el fotoperíodo son las siguientes:

Temperatura: 23 ± 3 °C

Humedad: 50 ± 20 %

Ciclo de luz: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad

14.2 Alimentación de los monos

Todos los animales tienen acceso libre al agua y se alimentan dos veces al día con una dieta completa nutricionalmente equilibrada enriquecida con frutas de estación.

Composición de la dieta (%)	
Hidratos de carbono	de ~51,8 %
Proteína bruta	≥ 16,0
Grasa bruta	≥ 4,0
Hidratación	≤ 10,0
Ceniza	≤ 7,0
Fibra	≤ 4,0
Calcio	0,8~1,2
Fósforo	0,6~0,8

14.3 Compuesto, formulación y suministros

El compuesto formulado comprende 25 mg/ml de gluco-PEG-FGF21 en 20 mM de Tris HCl, 70 mM de cloruro de sodio, pH 7,5.

14.4 Agrupación. Procedimiento y tratamiento experimental

14.4.1 Agrupación

Se realizará el cribado de treinta monos cynomolgus diabéticos espontáneos para seleccionar a 24 sujetos de monos diabéticos que se ajusten a los criterios de inclusión del estudio. Se recolectará el suero de al menos treinta (30) animales y se medirán varios parámetros, tales como la glucosa, la insulina, los lípidos, las enzimas hepáticas, etc. Los animales seleccionados (n = 24) se incluirán en el estudio y se distribuirán de forma uniforme entre los grupos experimentales con respecto a su peso corporal y niveles de glucosa, lípidos e insulina.

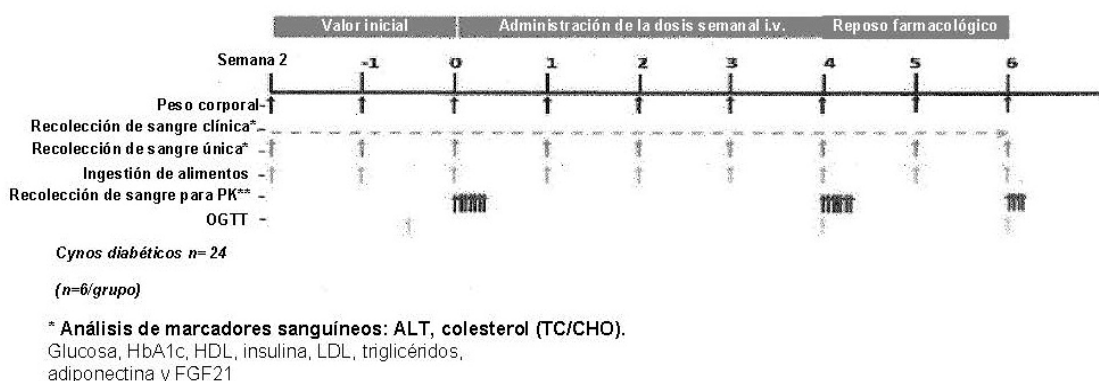
Los animales diabéticos seleccionados para el estudio se tratarán con el vehículo o con el artículo de prueba como se describe en la Tabla 12.

Tabla 12: Diseño de grupos, dosis, frecuencia y vía de administración

Grupo	N	Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg)	Concentración (mg/ml)	Volumen de dosis (ml/kg)	Vía de administración	Días de administración de la dosis
1	6	Vehículo (PBS)	0		0,2	S.C.	0, 7, 14, 21, 28
2	6	gluco-PEG-FGF21	1	5	0,2	S.C.	0, 7, 14, 21, 28
3	6	gluco-PEG-FGF21	1	5	0,2	S.C.	0, 14, 28
4	6	gluco-PEG-FGF21	2	10	0,2	S.C.	0, 14, 28

14.4.2 Procedimientos experimentales y pauta terapéutica con glucol-PEG-FGF-21

Más abajo se presenta un diagrama de flujo del diseño experimental y la recogida de datos para el Ejemplo 14.



El estudio comprende dos fases: una fase anterior al tratamiento y una fase de tratamiento. Los efectos se observarán después de la administración subcutánea (s.c.) del vehículo o del compuesto formulado gluco-PEG-FGF21. El curso temporal de la observación, la recogida de datos y el tratamiento se muestran en el diagrama de flujo (anterior) y también se resumen en la Tabla 13.

Fase anterior al tratamiento---Todos los animales experimentales tendrán 1 semana para aclimatarse seguido de 2 semanas para la recogida de datos iniciales de la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) oral, la bioquímica

(triglicéridos, HDL, LDL, ALT, glucosa), del peso corporal (BW), FGF-21 y la ingestión de alimentos. Los animales ayunarán durante toda la noche para la medición del peso corporal y la recolección de muestras de sangre para la medición de lípidos y la glucemia. La GTT oral con glucosa-plátano (1,0 g/kg de glucosa + 10 g/kg de plátano: la glucosa se enterró en medio del plátano y luego se alimentó a los animales) (0, 15, 30, 60, 120, 180 min) se realizará en el día 0 como valor inicial.

Tratamiento---Los animales se tratarán mediante administración s.c. con el vehículo (PBS) o gluco-PEG-FGF21 de acuerdo con la Tabla 12. Los animales ayunarán durante toda la noche antes del tratamiento. Después de la primera y última (día 28) administración s.c. de la dosis, se recolectará una serie de muestras de sangre para la farmacocinética (PK) antes de la dosis, 6, 24, 48, 72, 120 y 168 horas después de la dosis. El día 14, a todos los animales se les extraerá la sangre para la PK antes de la siguiente administración de la dosis. Se extraerá sangre para el bioanálisis de PK (2 ml/por tiempo) en un tubo adecuado a partir de una vena safena o cefálica que se inserta con una aguja con alelas para el ensayo farmacodinámico (PD). Se permitirá que todas las muestras se coagulen brevemente a temperatura ambiente y luego se centrifuguen a 4 °C a 3500 rpm durante 10 minutos. El suero se transferirá a viales de polipropileno con tapón de rosca previamente rotulados y se almacenará inmediatamente en un congelador a -80 °C hasta su análisis. El consumo de alimentos se realizará semanalmente; la GTT oral con glucosa-plátano se realizará en la semana 4.

Reposo farmacológico---Durante el período de reposo farmacológico de 2 semanas, la medición del peso corporal y la ingestión de alimentos se realizarán semanalmente y la recolección de sangre para el análisis bioquímico y la PK (días 42, 43 y 44) se realizará al final del período de reposo farmacológico. La GTT oral con glucosa-plátano se realizará en la semana 6.

Durante el estudio se realizará un seguimiento de las observaciones clínicas, tales como la actividad del animal, el comportamiento, el apetito y la diarrea. Cualquier cambio anormal se registrará y notificará.

14.5. Recolección de la muestra de sangre y cosecha del suero

Tabla 13: Puntos temporales y volúmenes de sangre para el estudio de PK/PD

Semana del estudio	Día del estudio	Administración de la dosis	Volumen de sangre (ml) por elemento			
			PD*	HbA1c	PK	GTT oral con glucosa-plátano
-2	-14		2,5	1,0		
-1	-7		2,5			Una gota de sangre x 5
0	0	x	2,5	1,0	2,0 x puntos temporales	
1	7	x**	2,5			
2	14	x	2,5	1,0	2,0 x 1 punto temporal	
3	21	x**	2,5			
4	28	x	2,5	1,0	2,0 x puntos temporales	Una gota de sangre x 5

(continuación)

Semana del estudio	Día del estudio	Administración de la dosis	Volumen de sangre (ml) por elemento			
			PD*	HbA1c	PK	GTT oral con glucosa-plátano
5	35		2,5			
6	42		2,5	1,0	2,0 x puntos temporales	Una gota de sangre x 5
* insulina, triglicéridos, TC, HDL, LDL, ALT, glucosa, adiponectina						
**solo a los grupos 1 y 2						
GTT oral con glucosa-plátano: La glucemia se medirá mediante un glucómetro a través de una punción en la vena de la cola sin recolección de sangre después de los puntos temporales: 0', 15', 30', 60', 120', 180'.						

14.5.1 Muestras para el ensayo de PK y adiponectina

Se recolectarán las muestras de sangre (2 ml/por tiempo) de la vena cefálica o safena en los tubos para separación de suero BD Vacutainer®, inmediatamente antes de la administración de la dosis y en puntos temporales en serie (antes de la dosis, 6, 24, 48, 72, 120 y 168 horas después de la dosis). Se permitirá que todas las muestras se coagulen durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifuguen en una centrífuga refrigerada (4 °C) a 3500 rpm durante 10 minutos. El suero se transferirá a viales de polipropileno con tapón de rosca previamente rotulados y se almacenará inmediatamente en un congelador a -80 °C hasta su análisis como se describe en la presente descripción anteriormente.

En este estudio de análisis de muestras (Alliance Pharma), una microplaca de 96 pocillos se recubrió con un

anticuerpo monoclonal IgG1, anti-FGF21 de ratón (anticuerpo de captura). El analito (TEV-47948) presente en los estándares, los controles de calidad (QC) y las muestras de prueba del suero de los animales probados se unieron al anticuerpo de captura en la placa. El TEV-47948 se unió además al anticuerpo monoclonal IgM anti-PEG de ratón, marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) que catalizó el sustrato cromogénico de la HRP 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), lo que produjo un color azul. El color azul luego cambió a amarillo mediante la adición de una solución de parada que contenía ácido sulfúrico, lo que resultó en una absorbancia máxima a 450 nm. La absorbancia a 450 nm, menos la lectura de fondo a 562 nm, fue proporcional a la cantidad de TEV-47948 en los estándares de calibración, las muestras de QC y las muestras de prueba.

14.5.2 Muestras para el ensayo de PD y adiponectina

Se recolectarán muestras de sangre (2,5 ml/por tiempo) de la vena cefálica o safena en los tubos para separación de suero BD Vacutainer®, según la Tabla 13 anterior. Se permitirá que todas las muestras se coagulen durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifuguen en una centrífuga refrigerada (4 °C) a 3500 rpm durante 10 minutos. El suero se transferirá a viales de polipropileno con tapón de rosca previamente rotulados y se almacenará inmediatamente en un congelador a -80 °C hasta su análisis.

Los parámetros de la química del suero (triglicéridos, HDL, LDL, ALT, glucosa) se medirán mediante el uso del sistema ADVIA®R2400 (SIEMENS). La insulina en suero se medirá con quimioluminiscencia mediante el uso del sistema de inmunoensayo ADVIA Centaur®R XP (SIEMENS).

Para la adiponectina, se recolectará sangre venosa (1 ml/por tiempo) en un tubo de recolección de suero a partir de una vena apropiada de cada animal. La sangre se centrifugará a 2400 g durante 10 minutos en condiciones refrigeradas (establecidas para mantener +4 °C). El suero resultante se separará en 2 alícuotas (1.a alícuota de 200 µl; 2.a alícuota: el volumen restante de aproximadamente 100 µl que se observará), y se mantendrá en hielo común hasta que se transfiera a tubos individuales y se almacene a -80 °C. Las 2 alícuotas se mantendrán a -80 °C hasta que se analice el envío (con un registrador de temperatura).

En este estudio de análisis de muestras (Alliance Pharma), la adiponectina HMW en los estándares de calibración del ensayo, muestras de la matriz de control de calidad (mQC) y muestras de prueba del suero de los animales probados se unieron al anticuerpo monoclonal de ratón (MoAb) en la microplaca e se inmovilizaron. Después de eliminar mediante el lavado cualquier sustancia no unida, se añadió un MoAb conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) específico para la adiponectina HMW a los pocillos a los que la adiponectina HMW se unió, además. El MoAb conjugado con HRP catalizó el sustrato cromogénico de la HRP 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), lo que produjo un color azul. La adición de una solución de parada detuvo la reacción de HRP y TMB y cambió el color de azul a amarillo con una absorbancia máxima a 450 nm. La absorbancia a 450 nm, menos la lectura de fondo a 562 nm, fue proporcional a la cantidad de adiponectina HMW en los estándares de calibración, las muestras de la mQC y las muestras de prueba.

14.5.2 Muestras para el ensayo de HbA1c

Se recolectarán muestras de sangre (1,0 ml/por tiempo) de la vena cefálica o safena en los tubos BD Vacutainer® K2-EDTA, según la Tabla 13 anterior. Las muestras se transferirán inmediatamente a una nevera a 4 °C para su almacenamiento o se colocarán en hielo común y se enviarán para su análisis el mismo día. La HbA1c se medirá con HPLC mediante el uso de un ensayo estándar tal como, por ejemplo, el sistema de prueba de glucohemoglobina disponible a partir de BIO-RAD.

14.5.3 Muestras para el ensayo GTT oral con glucosa-plátano

Se obtendrá una gota de sangre a través de la punción de la vena de la cola para la medición de la glucemia mediante un glucómetro.

14.5.4 Muestras para el FGF21 endógeno

Se recolectarán muestras para el posible análisis del FGF-21 endógeno. Los ensayos para medir el FGF-21 están disponibles comercialmente y pueden realizarse mediante el uso, por ejemplo, del kit anti-FGF-21 vendido por BioVendor LLC, NC, Estados Unidos (núm. de catálogo RD191108200R) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Listado de secuencias

<120> Conjugados de péptidos de FGF-21 mutantes

5 <130> 730762

 <140>

 <141>

10 <160> 30

 <170> PatentIn versión 3.5

 <210> 1

15 <211> 182

 <212> PRT

 <213> Homo sapiens

 <400> 1

20

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 2
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 3

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Thr Gln Gly Ala
165 170 175

Met Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 4
<211> 182
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 4

ES 2 930 534 T3

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

<210> 5
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 5

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Thr Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 6
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 6

Met His Pro Thr Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

ES 2 930 534 T3

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

- 5 <210> 7
- <211> 182
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> mutante
- <400> 7

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Thr Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 8
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 8

ES 2 930 534 T3

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

<210> 9
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 9

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

<210> 10
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 10

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Thr
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 11
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 11

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Thr Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp

115

120

125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 12
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 12

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Thr His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 13
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 13

ES 2 930 534 T3

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

<210> 14
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 14

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Thr Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 15
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 182
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> mutante
 10 <400> 16

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Thr Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 17
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 17

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala
			20					25					30		

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Thr Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 18
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 18

ES 2 930 534 T3

[illegible]

<210> 19
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 19

ES 2 930 534 T3

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

<210> 20
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 20

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Thr Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro
145 150 155 160

Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly
165 170 175

Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 21
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 21

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Thr Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 22
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 22

ES 2 930 534 T3

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

<210> 23
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 23

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Thr Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro
145 150 155 160

Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly
165 170 175

Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 24
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 24

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Thr Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg
				165					170					175	

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 25
<211> 183
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 25

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Thr Pro
145 150 155 160

Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly
165 170 175

Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 26
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 26

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala
			20					25					30		

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Thr
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg

165

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 27
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 27

ES 2 930 534 T3

[illegible]

<210> 28
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante

<400> 28

ES 2 930 534 T3

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

Ser Pro Thr Tyr Ala Ser
180

<210> 29
<211> 28
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 29
gaggtcatat gcatccaatt ccagattc 28

<210> 30
15 <211> 26
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador de PCR

<400> 30

attcctcgag ttattaagag gcgtag 26

10

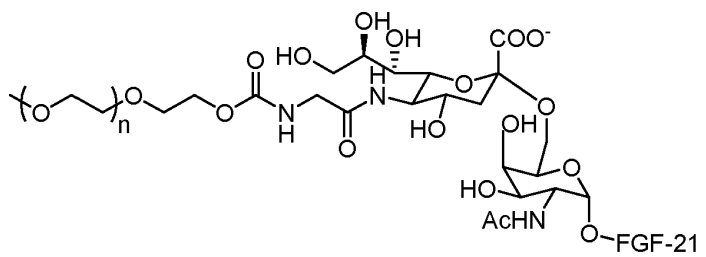
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de péptidos del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21 (FGF-21) mutante que comprende

- i) un péptido de FGF-21 mutante que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2,
- ii) una fracción de glucosilo, y
- iii) un polietilenglicol (PEG) de 20 kDa,

en donde el péptido de FGF-21 mutante se une a la fracción de glucosilo mediante un enlace covalente entre una treonina en la posición de aminoácido 173 de la SEQ ID NO: 2 y un primer sitio de la fracción de glucosilo y en donde la fracción de glucosilo se une al PEG de 20 kDa mediante un enlace covalente entre un segundo sitio de la fracción de glucosilo y el PEG de 20 kDa,

en donde el conjugado del péptido de FGF-21 mutante comprende la estructura:



en donde n es un número entero seleccionado de 450 a 460.

2. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado del péptido de FGF-21 mutante de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

3. Un método para producir el conjugado del péptido de FGF-21 mutante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

- (1) producir de forma recombinante el péptido de FGF-21 mutante en un huésped de expresión; y
- (2) unir enzimáticamente al péptido de FGF-21 mutante de la etapa (1) una fracción de PEG-glucosilo, en donde el PEG tiene 20 kDa, de esta manera se forma el conjugado del péptido de FGF-21 mutante.

4. El conjugado del péptido de acuerdo con la reivindicación 1, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso como un medicamento.

5. El conjugado del péptido o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, para su uso en un método para tratar la diabetes o una enfermedad relacionada con la diabetes.

6. El conjugado del péptido o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en un método para tratar la diabetes tipo 2, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), o el síndrome metabólico.

7. El conjugado del péptido o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el conjugado del péptido de FGF-21 mutante o la composición farmacéutica reduce los niveles de HbA1C, en donde reducir los niveles de HbA1C es indicativo de una reducción duradera en los niveles de glucemia en el tiempo.

8. El conjugado del péptido o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el medicamento debe administrarse a un sujeto humano.

9. El conjugado del péptido o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el medicamento debe administrarse una vez a la semana o una vez cada dos semanas.

10. Un contenedor farmacéutico que comprende el conjugado del péptido de FGF-21 mutante de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2.

Figura 1

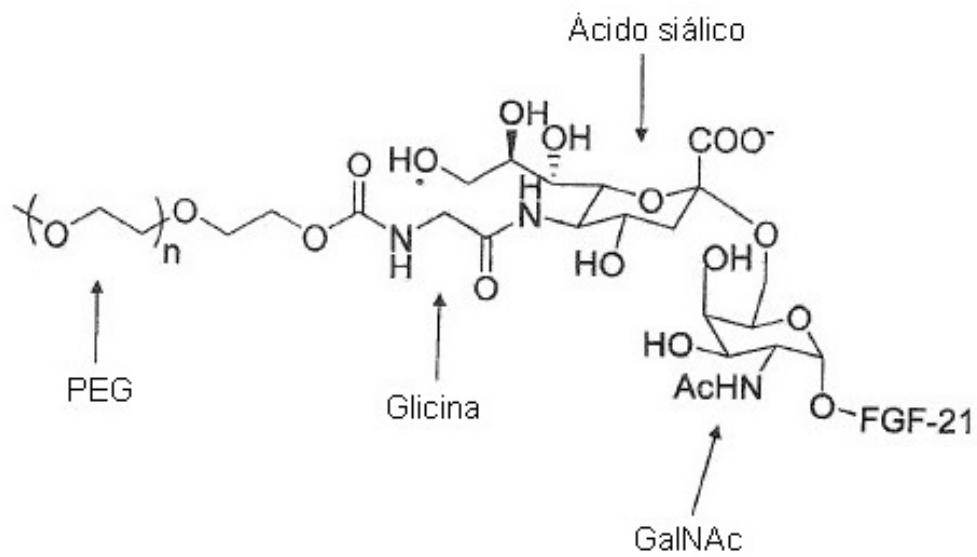


Figura 2

Motivo de secuencia	Rendimiento aislado global (mg/l)
Tipo salvaje	16
P ⁵ TSSP	29,8
P ⁵ TQAP	11,1
P ³ TP	18,6
M ¹ FPTP	20,4
P ¹²⁰ TINT	38
P ¹²⁰ TSVG	20
P ¹²⁰ TET	23,2
P ¹²⁵ TQA	33,1
P ¹²⁵ TEI	26,24
P ¹²⁹ TP	28,8
P ¹³⁹ TP	35,9
P ¹⁴⁸ TP	42
P ¹⁵¹ TINT	15,8
P ¹⁵¹ TTVS	70
P ¹⁵⁶ TP	19,8
P ¹⁵⁹ TVG	46,5
P ¹⁵⁹ TINT	20,8
TETP ¹⁶⁶	27,6
P ¹⁶⁶ TSMV	46
P ¹⁶⁶ TSVG	18,24
P ¹⁶⁶ TQGAM	24,8
P ¹⁷² TQGAS	25,9
P ¹⁷² TQGAM	52,6
P ¹⁷⁸ TQ	13,6
P ¹⁷⁸ TINT	32,8

Figura 3

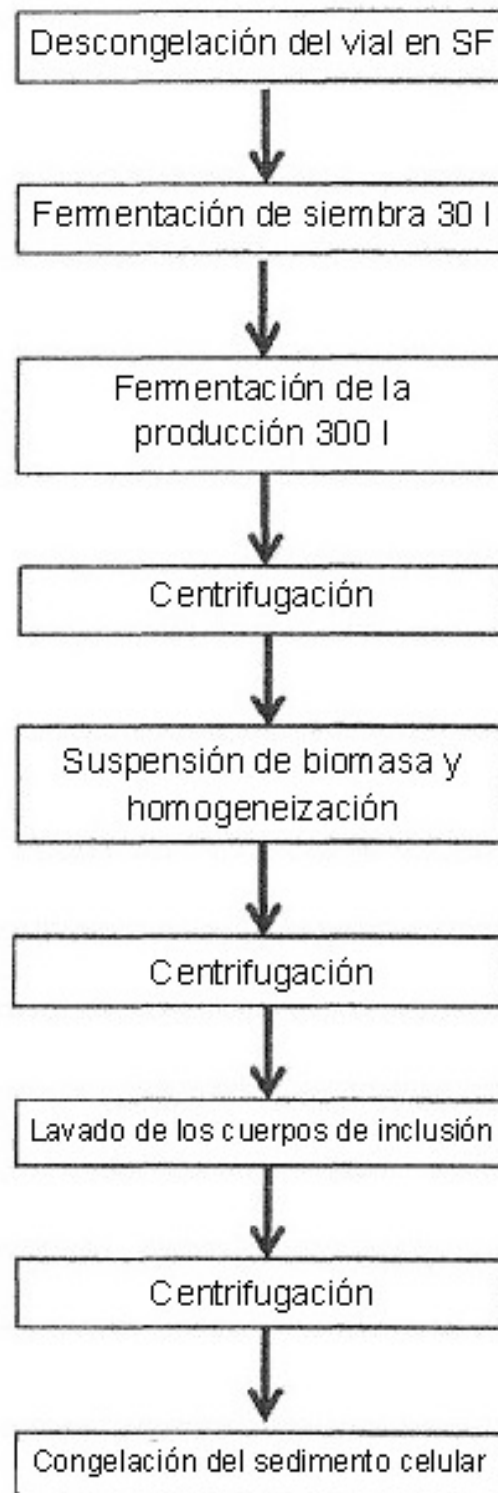


Figura 4

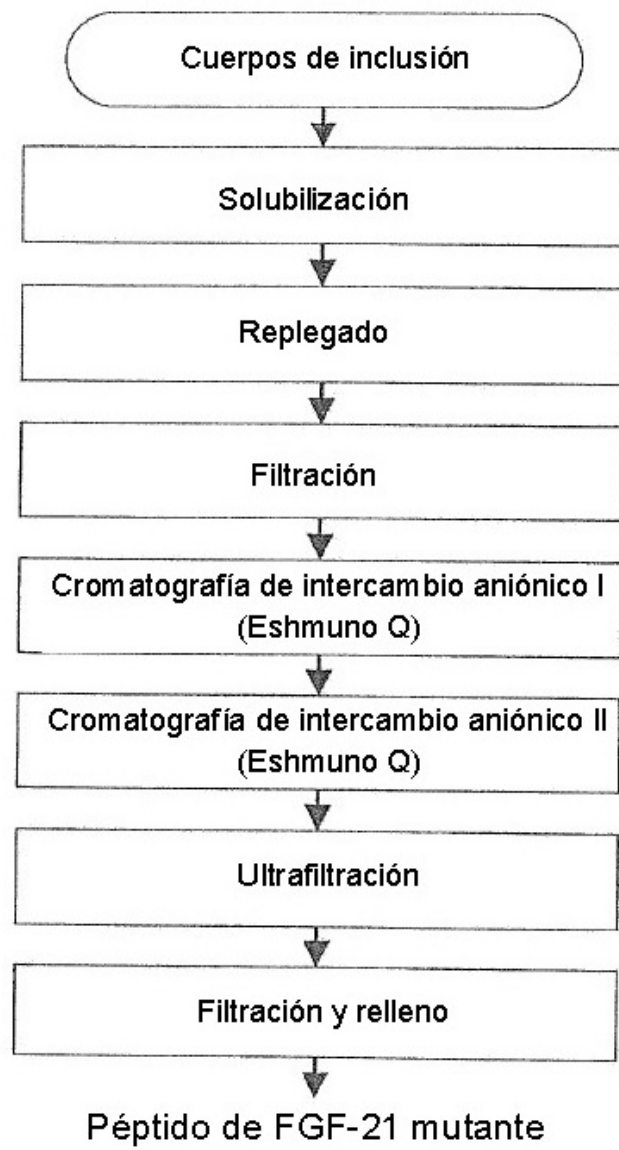


Figura 5

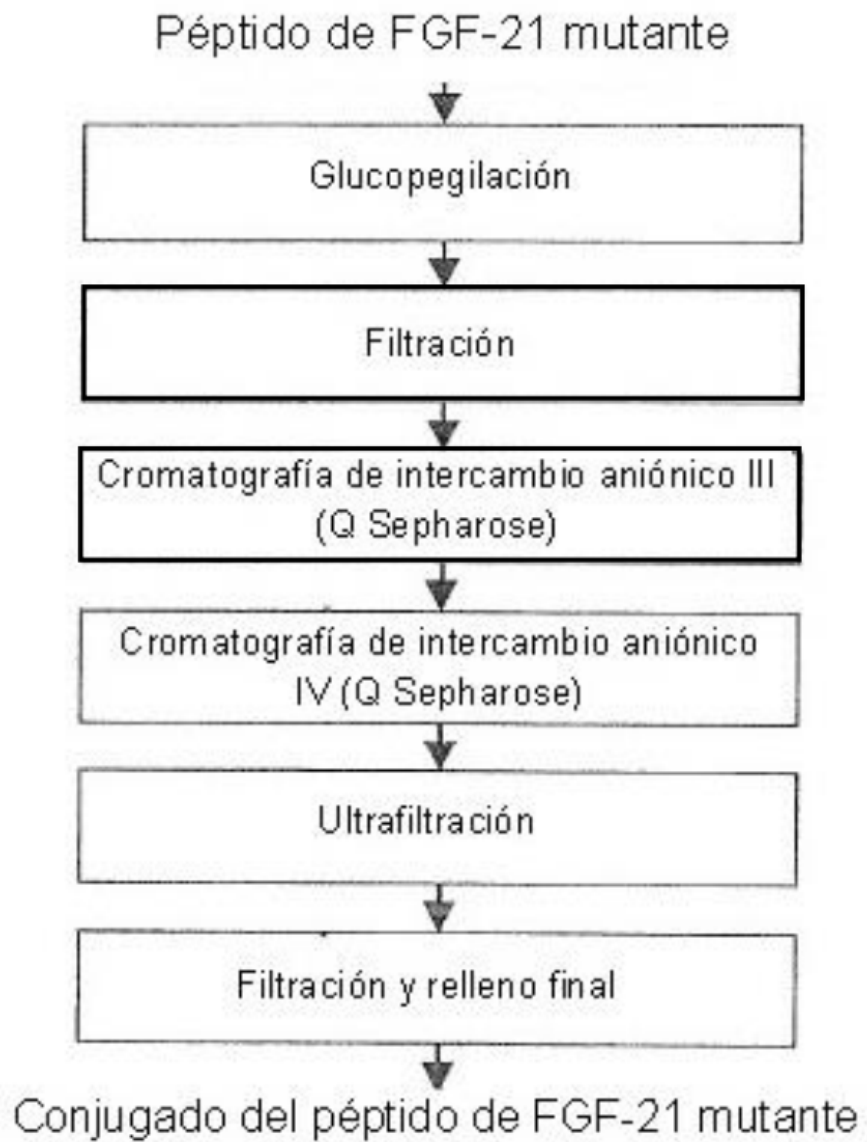
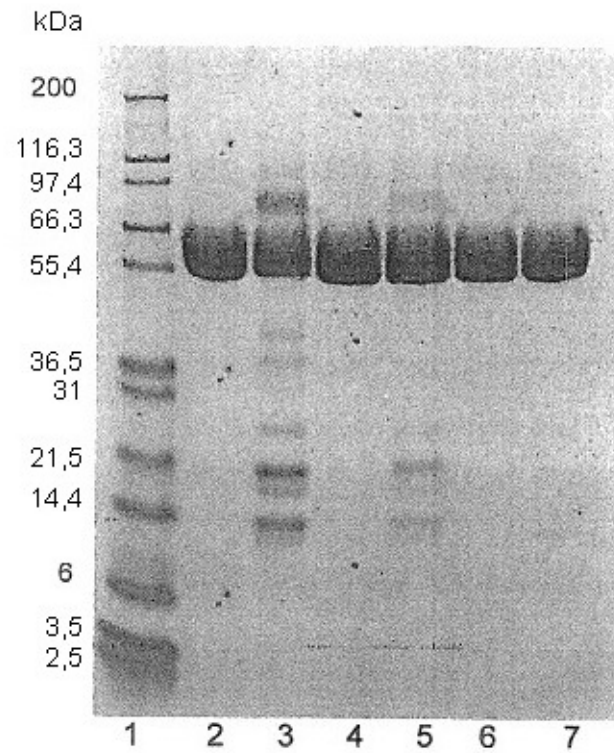
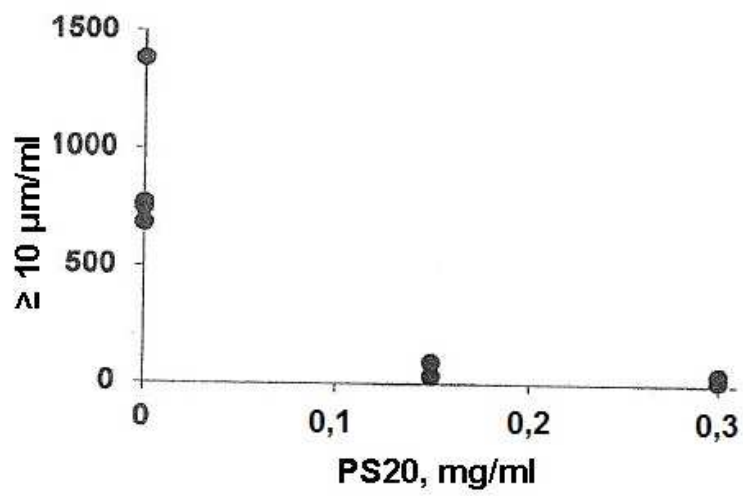


Figura 6



SDS-PAGE no reductora de muestras del conjugado del péptido de FGF-21 mutante almacenadas durante 1 semana a (2-8) °C y 40 °C

Figura 7



Concentración de partículas subvisibles $\geq 10 \mu\text{m}$ en función de la concentración de polisorbato 20.

Figura 8

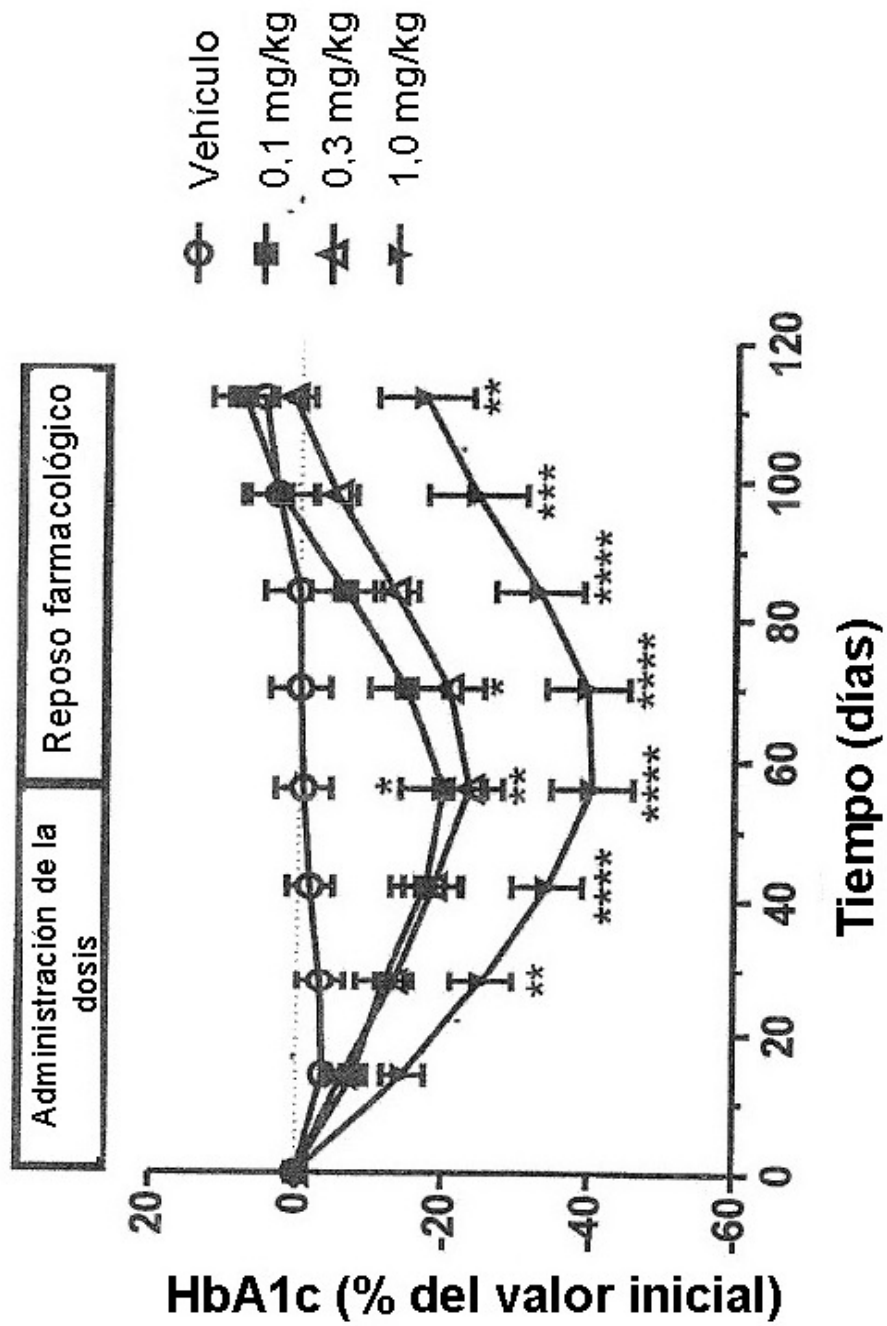


Figura 9

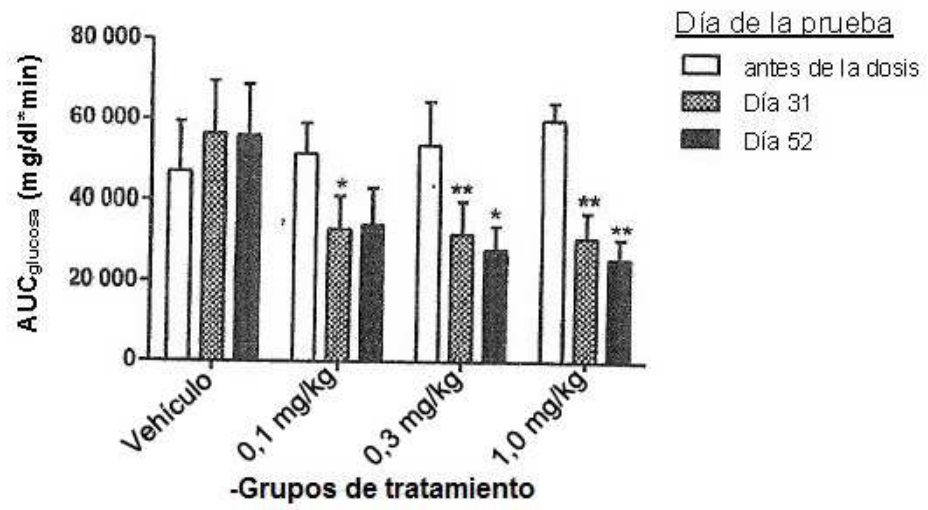


Figura 10

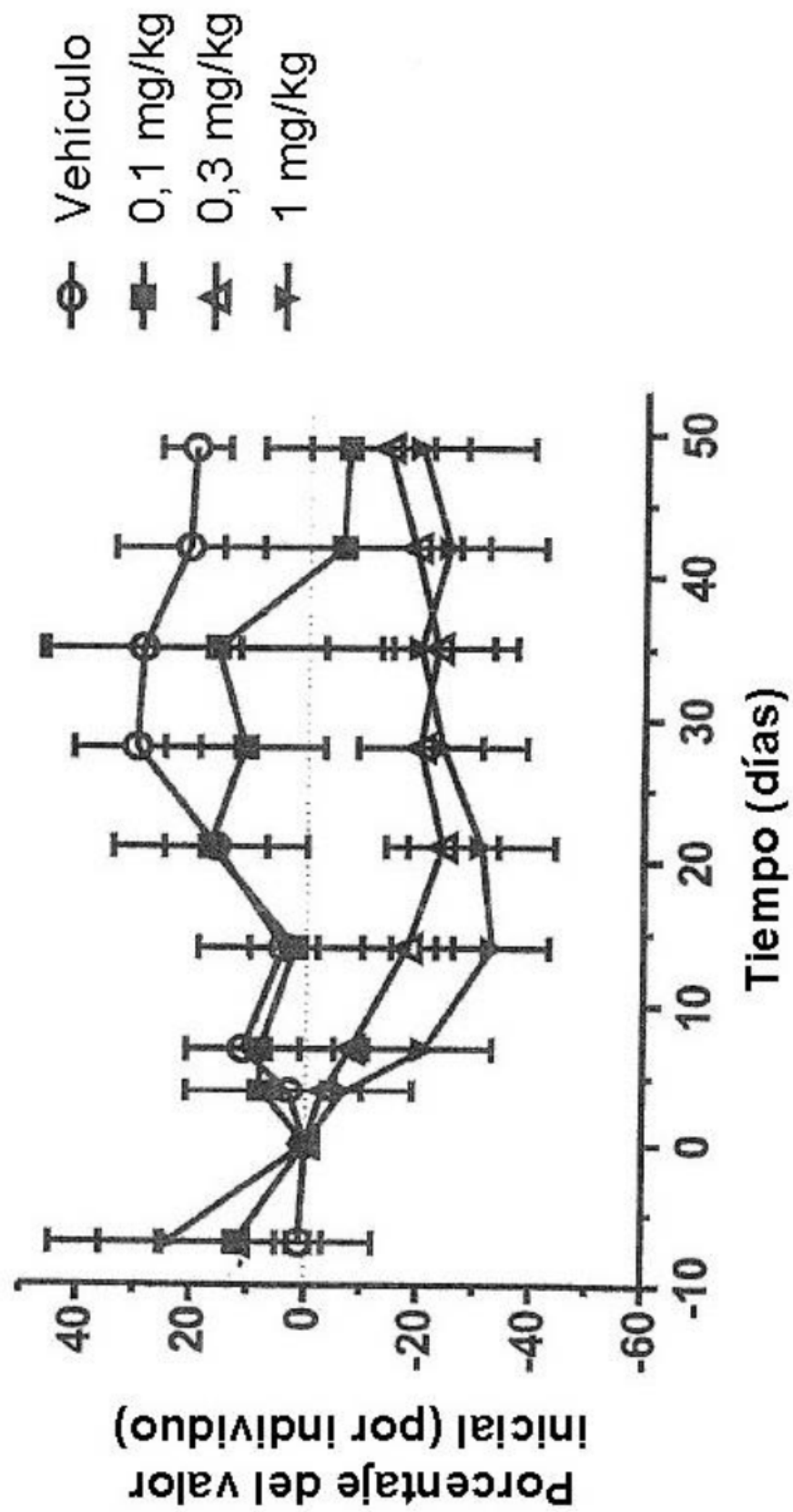


Figura 11

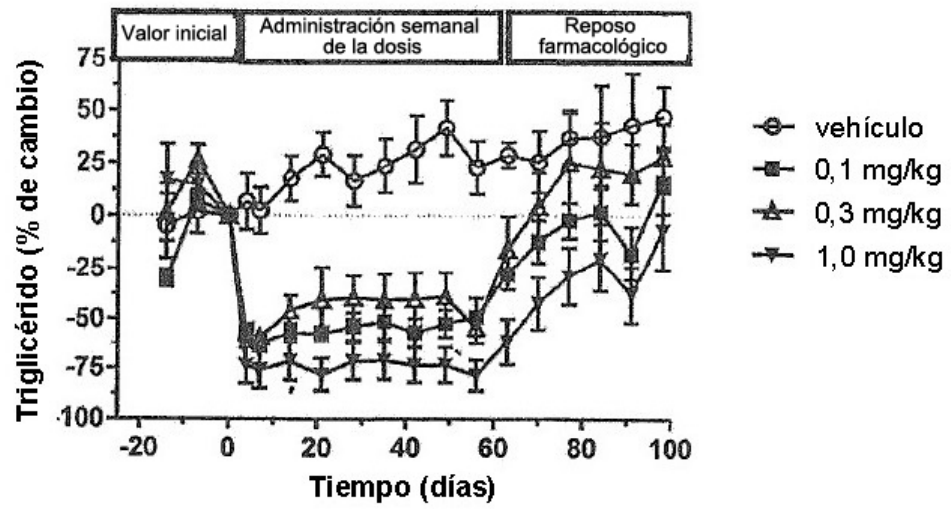


Figura 12

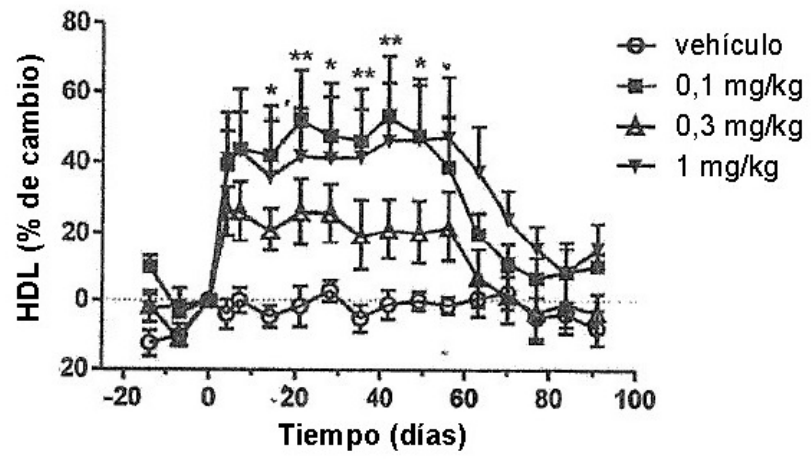


Figura 13

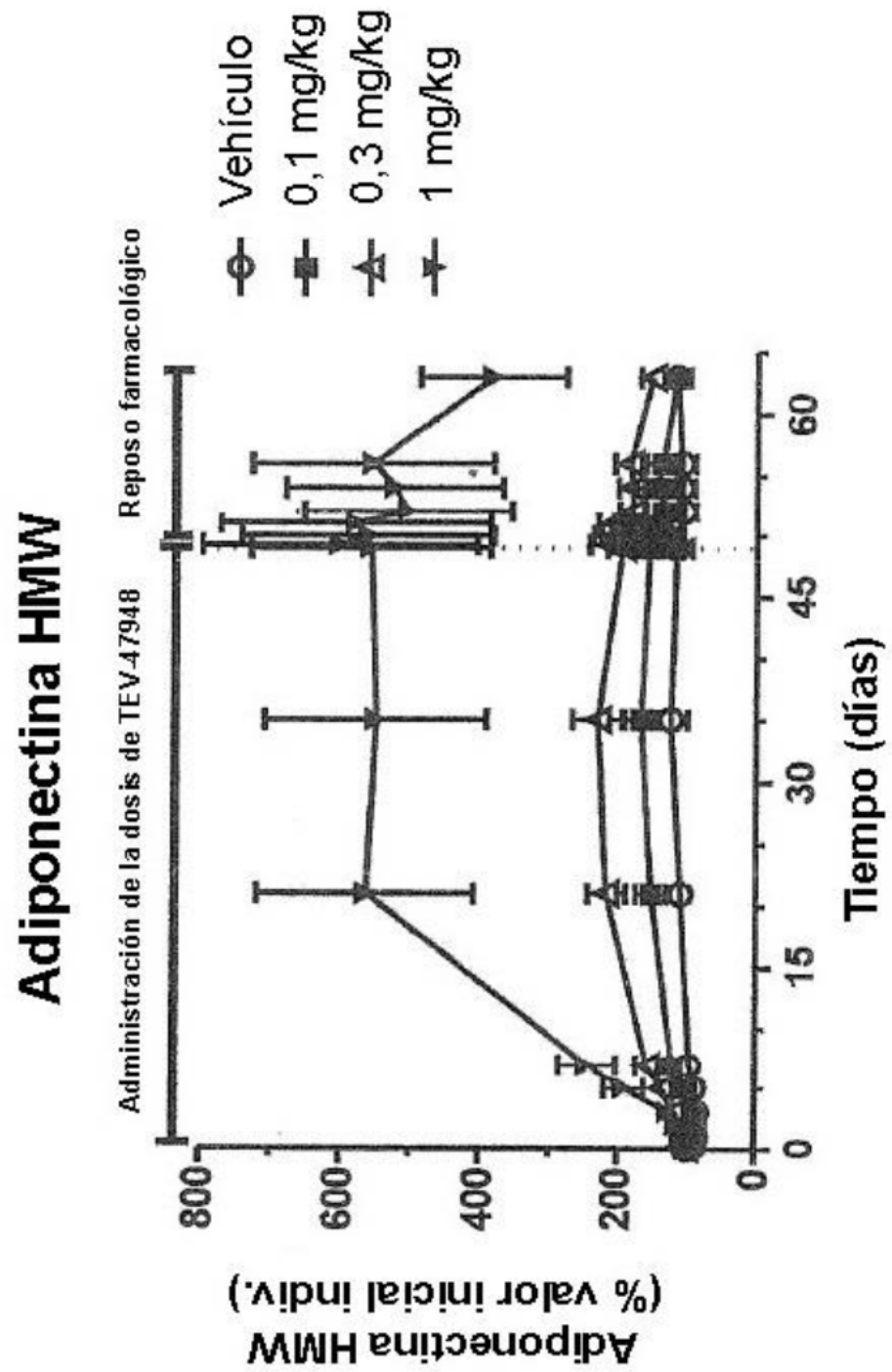
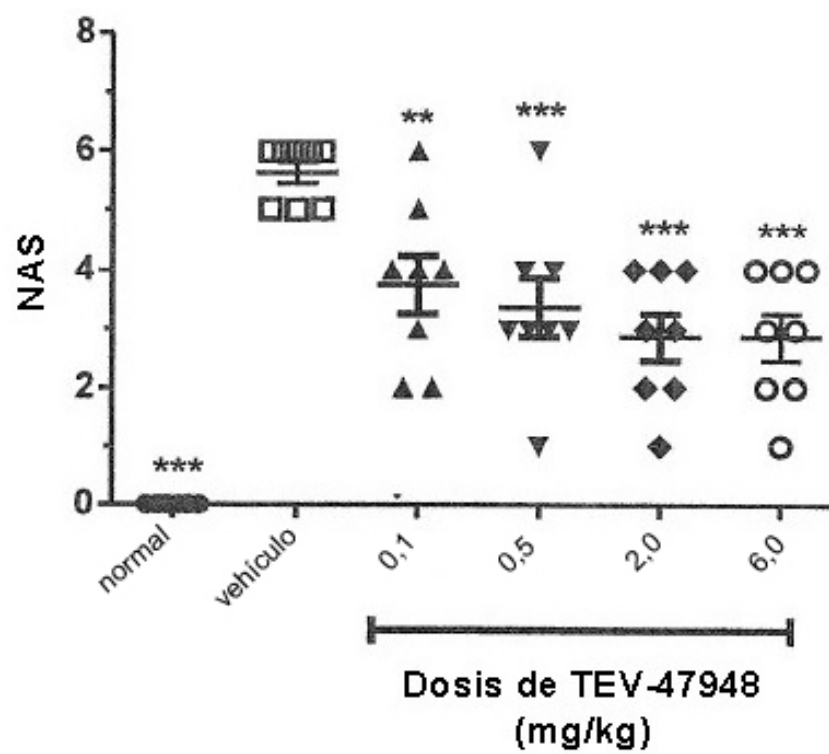
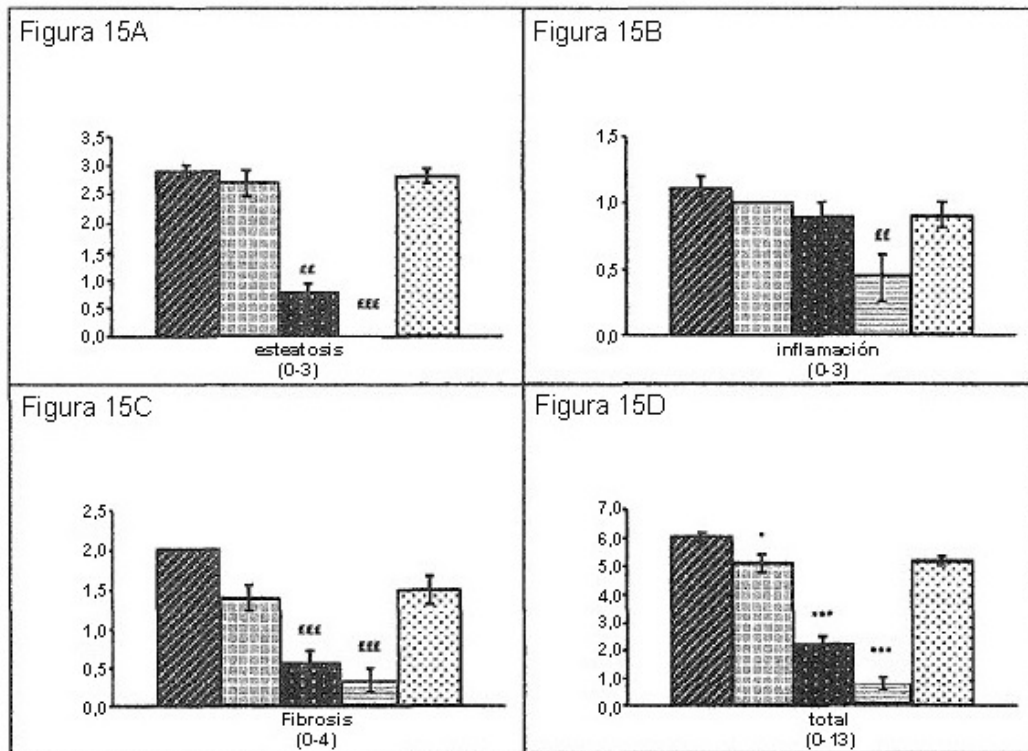


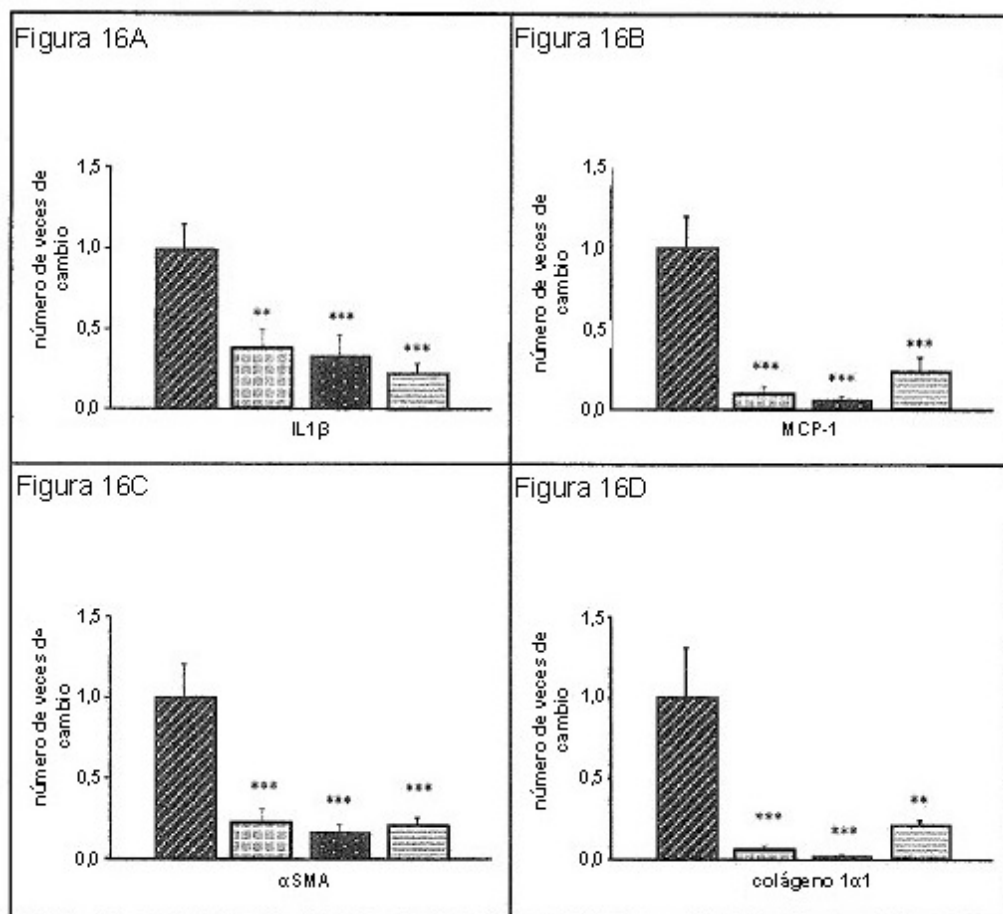
Figura 14





* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ frente al vehículo (ANOVA unidireccional + prueba a posteriori de Dunnett)
 $\&p < 0,01$, $\&\&p < 0,001$ frente al vehículo (Kruskal-Wallis + prueba a posteriori de Dunns)

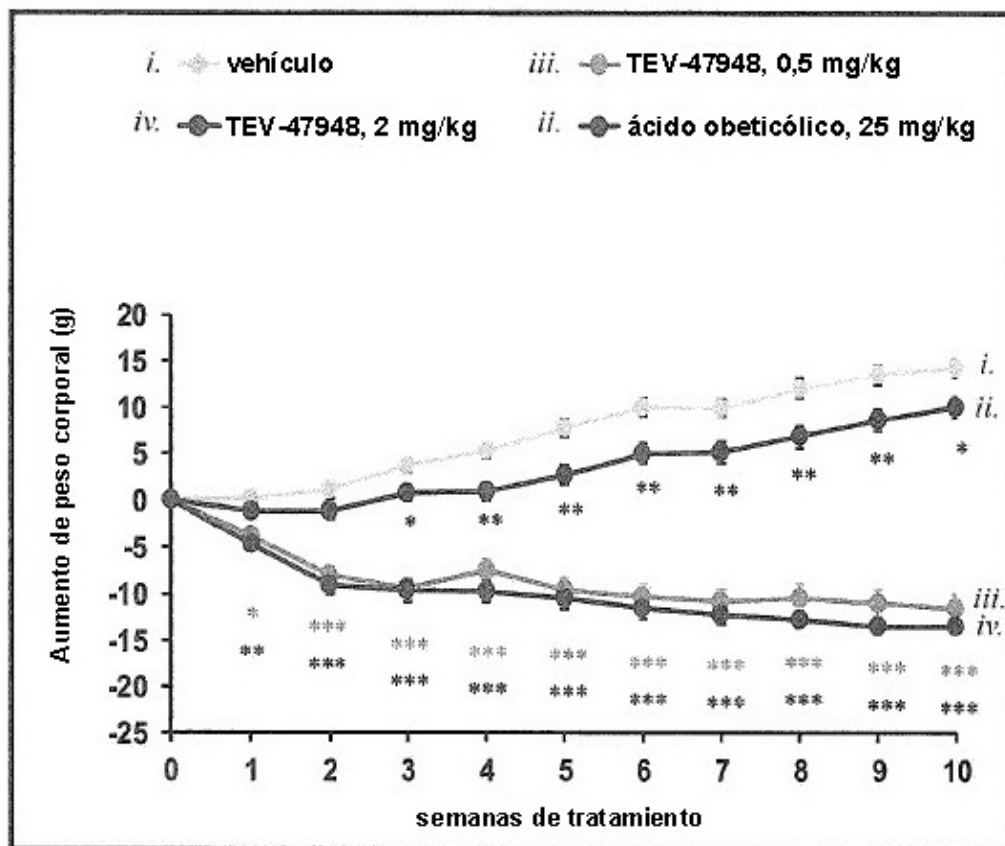
- NaCl 0,9 %
- ▨ TEV-47948, 20 µg/kg
- TEV-47948, 100 µg/kg
- ▨ TEV-47948, 500 µg/kg
- ▨ ácido obeticolico + NaCl al 0,9 %



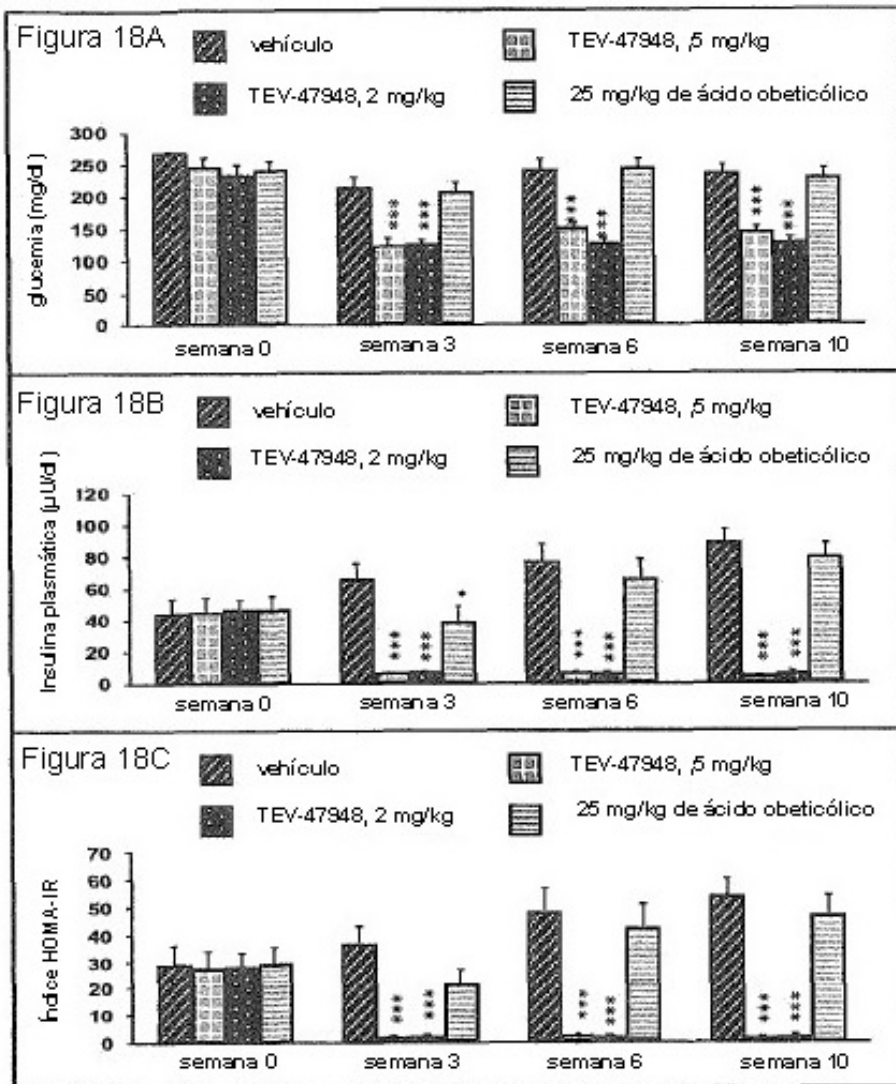
****p<0,01, ***p<0,001 frente al vehículo**

-  **vehículo**
-  **TEV- 47948, 5 mg/kg**
-  **TEV- 47948, 2 mg/kg**
-  **25 mg/kg de ácido obeticólico**

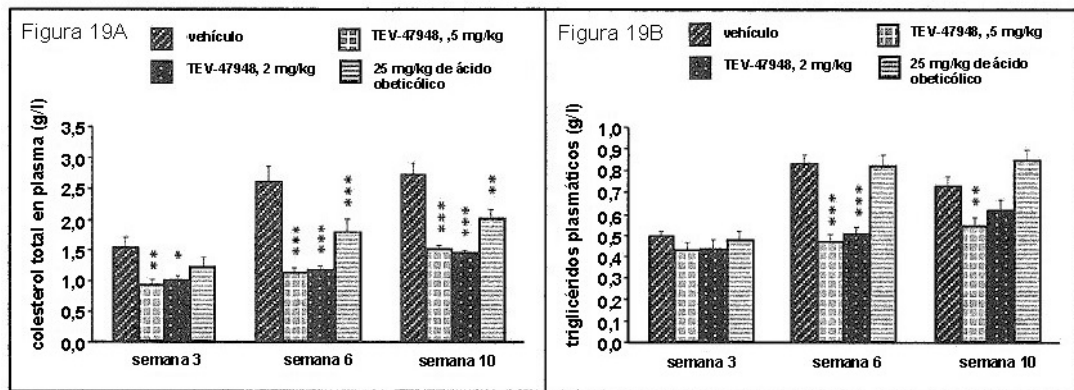
Figura 17



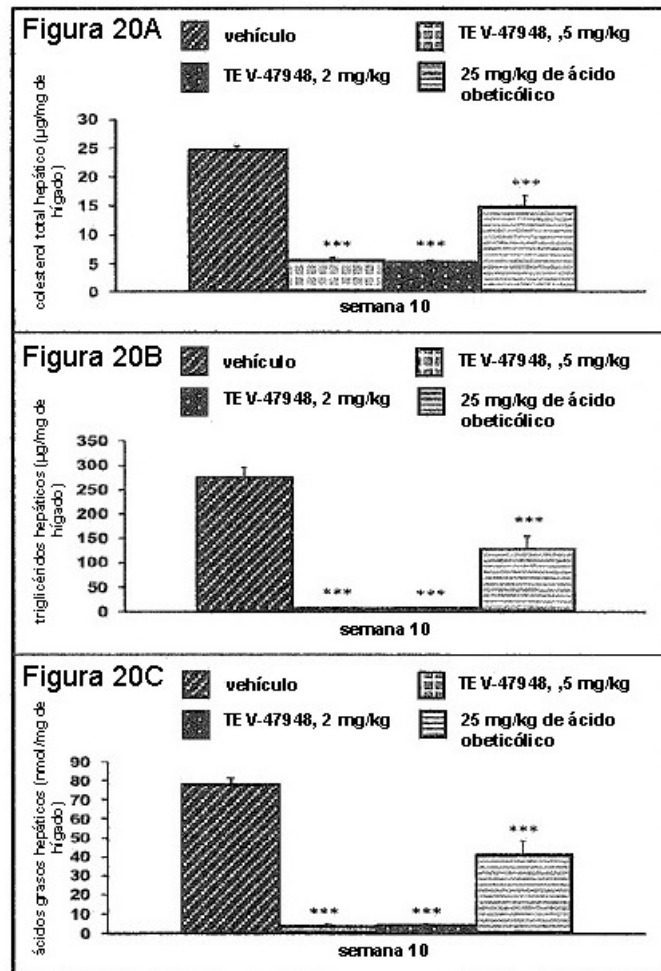
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al vehículo



*p<0,05, ***p<0,001 frente al vehículo



*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 frente al vehículo



***p<0,001 frente al vehículo