

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043102-00000-0000

Fecha: 2011-04-07 15:15:46

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 128

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

11-43102

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO MUTANTES FGF21 Y USO DE LOS MISMOS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 14/50

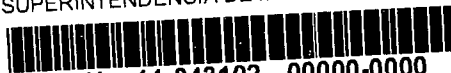
71. SOLICITANTE AMGEN INC.

DOMICILIO Thousand Oaks, California, Estados Unidos de América

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____

Polo, C
10-05-2011



No. 11-043102- -00000-0000

Fecha: 2011-04-07 15:15:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: AMGEN INC.

Dirección: One Amgen Center Drive,
Thousand Oaks, California 91320, Estados
Unidos.

Nacionalidad o domicilio: Thousand Oaks,
California, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: California, Estados
Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 **Fax:** 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número

41.654.882

TP

20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER HOJA ANEXA

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/060045 **Fecha** 08 de octubre de 2009

Publicación Internacional No. WO 2010/042747 A2 **Fecha** 15 de abril de 2010

6

TÍTULO (54) MUTANTES FGF21 Y USO DE LOS MISMOS1.

7

Clasificación Internacional (51)

C07K 14/50

8

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

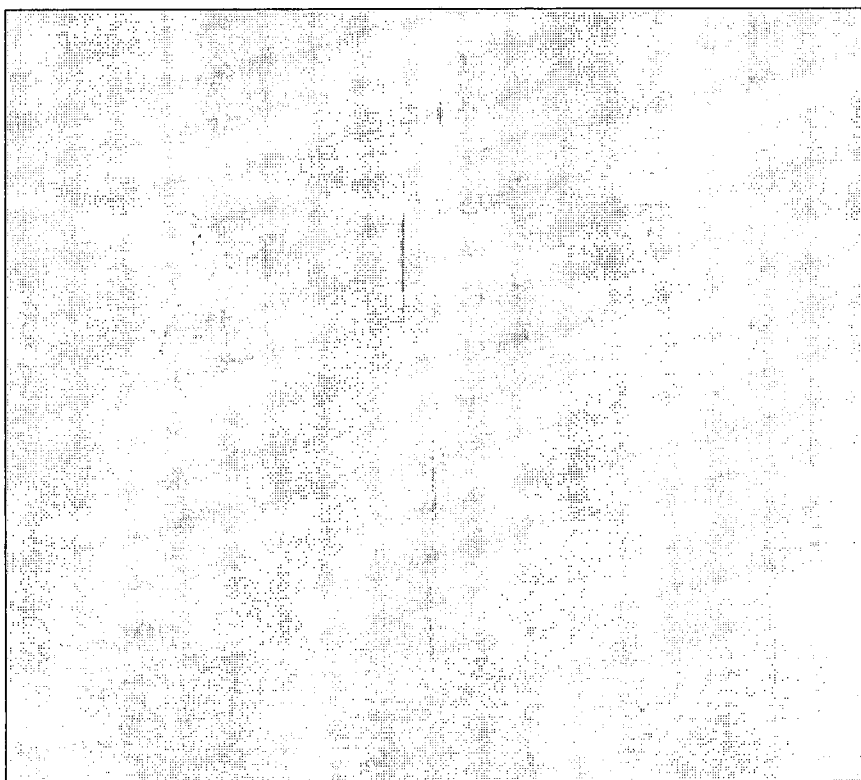
10 de octubre de 2008

(31) Número de Solicitud

61/195,761

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

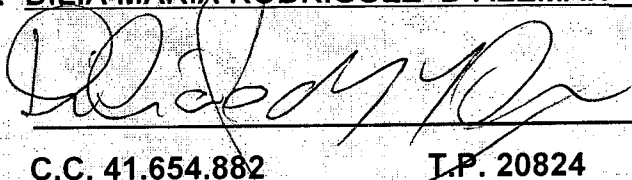
11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:


C.C. 41.654.882 T.P. 20824

ANEXO
INVENTORES

1) WALKER, Kenneth, W.

(175 Mesa Avenue, Newbury Park, California, 91320, Estados Unidos de America);

2.) GEGG, Colin V., Jr.

(736 Kenmore Circle, Newbury Park, California 91320, Estados Unidos de America);

3.) HECHT, Randy, I.

(2569 Piccadilly Circle, Thousand Oaks, California 91362, Estados Unidos de America);

4.) BELOUSKI, Edward, J.

(4541 La Tuna Court, Camarillo, California 93012, Estados Unidos de America);

5.) LI, Yue-Sheng

(3025 Shadow Hill Circle, Thousand Oaks, California 91360, Estados Unidos de America);

6.) MICHAELS, Mark, L.

(5007 Texhoma Avenue, Encino, California, 91316, estados Unidos de America);

7.) XU, Jing

(1677 Glider Court, Thousand Oaks, California, 91320, Estados Unidos de America);

8.) ELLISON, Murielle, M.

(645 Camino Manzanitas, Thousand Oaks, California 91360, Estados Unidos de America).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0026793

Bogotá D.C., Marzo 25 de 2011 - 07:06:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325077546	23/03/2011	95.510.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043102- -00000-0000

Fecha: 2011-04-07 15:15:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 25 de 2011 - 07:07:17

3

P-2878

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0026800

Bogotá D.C., Marzo 25 de 2011 - 07:06:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325077546	23/03/2011	95.510.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043102- -00000-0000

Fecha: 2011-04-07 15:15:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 25 de 2011 - 07:07:17

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0026801

Bogotá D.C., Marzo 25 de 2011 - 07:06:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325077546	23/03/2011	95.510.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043102-00000-0000

Fecha: 2011-04-07 15:15:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 25 de 2011 - 07:07:18

5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0026802

Bogotá D.C., Marzo 25 de 2011 - 07:06:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325077546	23/03/2011	95.510.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043102- -00000-0000

Fecha: 2011-04-07 15:15:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 25 de 2011 - 07:07:18

6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0026803

Bogotá D.C., Marzo 25 de 2011 - 07:06:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325077546	23/03/2011	95.510.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043102- -00000-0000

Fecha: 2011-04-07 15:15:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 25 de 2011 - 07:07:18

7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0026913

Bogotá D.C., Marzo 25 de 2011 - 07:06:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325077546	23/03/2011	95.510.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-043102- -00000-0000

Fecha: 2011-04-07 15:15:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Marzo 25 de 2011 - 07:07:21

RESUMEN

La invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos mutantes de FGF21, los polipéptidos mutantes de FGF21, las composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos mutantes FGF21, y los métodos para el
5 tratamiento de trastornos metabólicos usando esos ácidos nucleicos, polipéptidos, o composiciones farmacéuticas.

MUTANTES FGF21 Y USO DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 61/195, 761 presentada el 10 de octubre de 2008.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

10 La invención se refiere a moléculas ácido nucleico que codifican polipéptidos mutantes FGF21, polipéptidos mutantes FGF21, composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos mutantes FGF21, y los métodos para el tratamiento de trastornos metabólicos utilizando tales ácidos nucleicos, polipéptidos, o composiciones farmacéuticas.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 FGF21 es un polipéptido secretado que pertenece a una subfamilia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) que incluye FGF19, FGF21 y FGF23 (Itoh *y otros.*, 2004, *Trend Genet* 20: 563-69). FGF21 es un FGF atípico en que es independiente de la
20 heparina y funciona como una hormona en la regulación de la glucosa, lípidos y metabolismo de la energía.

 El FGF21 fue aislado a partir de una biblioteca de ADNc del hígado como un factor hepático secretado. Se expresa altamente en el hígado y el páncreas, y es el único miembro de la familia de los FGF que se expresa primariamente en el hígado. Los ratones
25 transgénicos que sobreexpresan FGF21 exhiben fenotipos metabólicos con velocidades de crecimiento lento, bajos niveles de triglicéridos y de glucosa en plasma, y una ausencia de diabetes tipo 2 asociada a la edad, hiperplasia de los islotes y obesidad. La administración farmacológica de la proteína FGF21 recombinante en modelos de roedores diabéticos resulta en niveles normalizados de glucosa en el plasma, niveles de triglicéridos y
30 colesterol reducidos, y sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa mejoradas. Además, el FGF21 reduce el peso corporal y la grasa corporal mediante el incremento del gasto de energía, la actividad física, y la velocidad metabólica. La investigación experimental proporciona soporte para la administración farmacológica de FGF21 para el tratamiento de la diabetes tipo 2, la obesidad, las dislipidemia y otras enfermedades o
35 trastornos metabólicos en los seres humanos.

 El FGF21 humano tiene una corta vida media *in vivo*. En ratones y monos macacos cynomolgus, la vida media efectiva del FGF21 humano es de 1 a 2 horas. En el

desarrollo de una proteína FGF21 para su uso como agente terapéutico en el tratamiento de la diabetes tipo 2, sería deseable un aumento en la vida media. Las proteínas FGF21 que tienen una vida media incrementada permitirían la dosificación menos frecuente a los pacientes a quienes se les está administrando la proteína.

5

SUMARIO DE LA INVENCION

En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de sec. con núm. de ident.: 4 que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es:

- 10 (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175; (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179; (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122; (d) un residuo de glicina en la posición 170; (e) un residuo de glicina en la posición 171; y combinaciones de (a) – (e).

- 15 En otra modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es: (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175; (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 20 126, 175, 170, y 179; (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122; (d) un residuo de glicina en la posición 170; (e) un residuo de glicina en la posición 171; y combinaciones de (a) – (e), y que comprende adiciones, deleciones o sustituciones adicionales que hacen el polipéptido al menos 85% idéntico a la sec. con núm. de ident.:4, siempre que la al menos una sustitución de aminoácidos de la 25 Reivindicación 1(a) – (e) no sea modificada adicionalmente.

La presente invención también proporciona vectores y células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

- En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 que 30 tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es: (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126y 175; (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179; (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122; (d) un residuo de glicina en la posición 170; (e) un residuo de glicina en la posición 171; y 35 combinaciones de (a) – (e),

En aún otra modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de sec.

con núm. de ident.: 4 que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es: (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175; (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179; (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122; (d) un residuo de glicina en la posición 170; (e) un residuo de glicina en la posición 171; y combinaciones de (a) – (e), y que comprende adiciones, deleciones o sustituciones adicionales que hacen el polipéptido al menos 85% idéntico a la sec. con núm. de ident.:4, siempre que la al menos una sustitución de aminoácidos de la Reivindicación 1(a) – (e) no sea modificada adicionalmente.

En aún otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es: (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175; (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179; (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122; (d) un residuo de glicina en la posición 170; (e) un residuo de glicina en la posición 171; y combinaciones de (a) – (e), y que comprende adiciones, deleciones o sustituciones adicionales que hacen el polipéptido al menos 85% idéntico a la sec. con núm. de ident.:4, siempre que la al menos una sustitución de aminoácidos de la Reivindicación 1(a) – (e) no sea modificada adicionalmente.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición que comprende un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 opcionalmente que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es: (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175; (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179; (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122; (d) un residuo de glicina en la posición 170; (e) un residuo de glicina en la posición 171; y combinaciones de (a) – (e), unidos por un enlazador a un segundo polipéptido que comprende a polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 opcionalmente que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es: (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175; (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179; (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122; (d) un residuo de glicina en la posición 170; (e) un residuo de glicina en la posición 171; y combinaciones de (a) – (e).

La presente invención también proporciona formas químicamente modificadas de los polipéptidos de la presente invención. Las formas químicamente modificadas de los

polipéptidos comprenden un polímero unido al N-terminal y/o un sitio de unión al polímero de origen natural o no natural. La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento de desordenes metabólicos tales como la obesidad y la diabetes que comprenden administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención a un paciente que necesita de éstas.

Las realizaciones específicas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas realizaciones y las reivindicaciones.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un dibujo que representa una molécula de FGF21 que tiene dos polímeros (*por ejemplo*, moléculas de PEG) unida a la secuencia.

La Figura 2 comprende cuatro geles de SDS-PAGE, que muestran el grado de PEGilación de nueve mutantes FGF21 que tienen un único sitio de unión al polímero creado por ingeniería genética, que se han modificado químicamente con PEG, a saber, E37C, R77C y H125C (izquierda superior), D38C, D46C y D79C (derecha superior), H87C, E91C, G113C (izquierda inferior) y G120C, R126C, N121C (derecha inferior).

La Figura 3 comprende un gel de SDS-PAGE, que muestra el grado de PEGilación de tres mutantes FGF21 que tienen un único sitio de unión al polímero creado por ingeniería genética, que se han modificado químicamente con una molécula de maleimida metoxi PEG de 20 kDa, a saber, K69C, R175C y Y179C.

La Figura 4 comprende dos esquemas que representan los resultados de un ensayo de ELK-luciferasa realizado en polipéptidos mutantes FGF21 que tienen un único sitio de unión al polímero creado por ingeniería genética, que se han modificado químicamente mediante la unión de una molécula de maleimida metoxi PEG de 20 kDa, a saber, E37C, R77C, E91C, el FGF21 de tipo salvaje y el FGF21 pegilado en el N-terminal (gráfico superior) y G113C, N121C, D46C, el FGF21 de tipo salvaje y el FGF21 PEGilado en el N-terminal (gráfico inferior).

La Figura 5 comprende dos esquemas que representan los resultados de un ensayo de ELK-luciferasa realizado en polipéptidos mutantes FGF21 que tienen un único sitio de unión al polímero creado por ingeniería genética, que se han modificado químicamente mediante la unión de una molécula de maleimida metoxi PEG de 20 kDa, a saber, H125C, G120C, R126C, el FGF21 de tipo salvaje y el FGF21 PEGilado en el N-terminal (gráfico superior) y D79C, D38C, el FGF21 de tipo salvaje y el FGF21 PEGilado en el N-terminal (gráfico inferior).

La Figura 6 comprende dos esquemas que representan los resultados de un ensayo de ELK-luciferasa realizado en polipéptidos mutantes FGF21 que tienen un único sitio de

13

unión al polímero creado por ingeniería genética, que se han modificado químicamente mediante la unión de una molécula de maleimida metoxi PEG de 20 kDa, a saber, K69C, D79C, el FGF21 de tipo salvaje y el FGF21 PEGilado en el N-terminal (gráfico superior), y el R175C, Y179C, el FGF21 de tipo salvaje y el FGF21 PEGilado en el N-terminal (gráfico inferior).

La Figura 7 es un dibujo que representa una molécula anclada de la presente invención.

La Figura 8 es un dibujo que representa el cambio en el porcentaje de los niveles de glucosa en sangre en ratones desde el tiempo 0 después de una única inyección del vehículo (PBS), el FGF21 de tipo salvaje o el FGF21 de tipo salvaje PEGilado en el N-terminal,

La Figura 9 es un diagrama que representa el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en sangre en ratones desde el tiempo 0 después de una única inyección del vehículo (PBS), el FGF21 de tipo salvaje y el FGF21 de tipo salvaje PEGilado en el N-terminal con moléculas maleimida metoxi PEG de 20, 30 ó 40 kDa.

La Figura 10 comprende dos esquemas que representan el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en sangre en ratones durante un período de nueve días desde el tiempo 0 después de una única inyección de PBS o de los polipéptidos mutantes FGF21 PEGilados en el N-terminal que comprenden las mutaciones R77C o R126K, los cuales fueron adicionalmente PEGilados en esos sitios de unión al polímero introducidos con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa y una fusión que comprende una molécula Fc y un polipéptido mutante FGF21 G170E (gráfico superior), o un polipéptido mutante pegilado en el N-terminal FGF21 que comprende las mutaciones R77C, el cual fue adicionalmente pegilado en este sitio de unión al polímero introducido con la molécula de maleimida metoxi PEG de 20 kDa, y P171G (gráfico inferior).

La Figura 11 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en sangre en ratones desde el tiempo 0 después de una única inyección del vehículo (fosfato de potasio 10 mM, sorbitol 5%, pH 8) o de los polipéptidos mutantes FGF21 que fueron doblemente pegilados con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en los sitios de unión al polímero, a saber, E91C/H125C, E91C/R175C, E37C/G120C, E37C/H125C y E37C/R175C; una fusión que comprende una molécula Fc y un polipéptido mutante FGF21 P171G también se estudió.

La Figura 12 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en sangre en ratones desde el tiempo 0 después de una única inyección del vehículo (fosfato de potasio 10 mM, sorbitol 5%, pH 8) o de los polipéptidos mutantes FGF21 que fueron doblemente pegilados con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en los sitios de unión al polímero, a saber, E91C/H121C, G120C/H125C o

14

E37C/R77C, una fusión que comprende una molécula Fc y un polipéptido mutante FGF21G170E y también se estudió.

La Figura 13 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en sangre en ratones desde el tiempo 0 después de una única inyección del
 5 vehículo (fosfato de potasio 10 mM, sorbitol 5%, pH 8) o de los polipéptidos mutantes FGF21 que fueron doblemente pegilados con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en los sitios de unión al polímero, a saber, E37C/R77C, E91C/R175C, E37C/H125C, E37C/R77C/P171G, E91C/R77C/P171G y E37C/R125C/P171G.

La Figura 14 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en los niveles de
 10 glucosa en sangre en ratones desde el tiempo 0 después de una única inyección del vehículo (fosfato de potasio 10 mM, sorbitol 5%, pH 8) o de los polipéptidos mutantes FGF21 que fueron doblemente pegilados con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en los sitios de unión al polímero, a saber, E37C/R77C/P171G y E91C/R125C/P171G, o moléculas ancladas que comprenden dos polipéptidos mutantes
 15 FGF21 idénticos que tienen las mismas mutaciones introducidas, a saber, R77C/P171G (2x) y R78C/P172G (2x), los cuales se unieron a través de una molécula de maleimida metoxi PEG de 20 kDa.

La Figura 15 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en sangre en ratones en función de la dosis desde el tiempo 0 después de una
 20 única inyección del vehículo (Tris HCl 10mM, NaCl 150mM, pH 8.5), o un polipéptido mutante FGF21 que fue doblemente pegilado con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en los sitios de unión al polímero, a saber, E37C/R77C/P171G, y administrado en dosis de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg o 1 mg/kg.

La Figura 16 es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal en ratones
 25 desde el tiempo 0 después de una única inyección del vehículo (fosfato de potasio 10 mM, sorbitol 5%, pH 8) o polipéptidos mutantes FGF21 que fueron doblemente pegilados con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en los sitios de unión al polímero, a saber, E37C/R77C, E91C/R175C, E37/H125C, E37C/R77C/P171G, E91C/R77C/P171G y E37C/R125C/P171G.

La Figura 17 es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal en ratones
 30 desde el tiempo 0 después de una única inyección del vehículo (fosfato de potasio 10 mM, sorbitol 5%, pH 8), de polipéptidos mutantes FGF21 que fueron doblemente pegilados con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en los sitios de unión al polímero, a saber, E37C/R77C/P171G y E91C/R125C/P171G, o moléculas ancladas que
 35 comprenden dos polipéptidos mutantes FGF21 que tienen las mismas mutaciones introducidas, a saber, R37C/P171G (2x) y R77C/P171G (2x), los cuales se unieron a través de una molécula de de maleimida metoxi PEG de 20 kDa.

15

La Figura 18 es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal en ratones en función de la dosis desde el tiempo 0 después de una única inyección del vehículo (Tris HCl 10mM, NaCl 150mM, pH 8.5), o un polipéptido mutante FGF21 que fue doblemente pegilado con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en los sitios de unión al polímero, a saber, E37C/R77C/P171G, y administrados en cinco dosis diferentes.

La Figura 19A-19F es una serie de seis gráficos que muestran el cambio en el peso corporal de ratones durante un estudio de la vacuola renal de ocho semanas con una dosis semanal del vehículo (cuadrados), 5 mg/kg (triángulos) y 25 mg/kg (círculos abiertos) de moléculas de FGF21 pegilado. Los ratones dosificados con PEG-FGF21 marcado con cisteína doble, mostraron una pérdida de peso sostenida, mientras que aquellos dosificados con moléculas ancladas mostraron pérdida de peso principalmente transitoria.

La Figura 20 comprende dos gráficos de barras que representan los resultados de un estudio de ocho semanas en la vacuola renal en ratones inyectados con el vehículo o con un polipéptido mutante FGF21 que fue doblemente pegilado con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en los sitios de unión al polímero, a saber, E37C/R77C/P171G; E37 / H125C/P171G; E91C/H125C/P171G; E37C/P171G; R77C/P171G y R77C / P171G, probándose dos dosis diferentes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Una proteína FGF21 humana con propiedades mejoradas, tal como una vida media incrementada, se puede preparar utilizando los métodos descritos en este documento y los métodos de biología molecular estándares. Se conoce que mediante la unión de uno o más polímeros solubles en agua, tales como moléculas de PEG, se puede prolongar la vida media a una proteína. Así, en varias realizaciones, la vida media del FGF21 nativo se puede prolongar mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos en la proteína para formar puntos en los cuales se puede unir un polímero a la proteína de FGF21. Estas proteínas modificadas se refieren en este documento como mutantes FGF21 y forman las realizaciones de la presente invención. Los polímeros también se pueden introducir en el extremo N-terminal de la molécula de FGF21 junto con la introducción no natural de un sitio de unión al polímero.

Los métodos del ácido nucleico recombinante que se utilizan en este documento, así como en los ejemplos, son en general los establecidos en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y otros. eds., Green Publishers Inc. y Wiley Sons, 1994), los cuales se incorporan en el presente documento mediante referencia para cualquier propósito.

1. Definiciones Generales

Tal como se usa en la presente, el término "un(o)" significa uno o más, a menos que se indique lo contrario.

El término "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico de la invención que (1) se ha separado de al menos el 50 por ciento de las proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los cuales ésta se encuentra de forma natural cuando el ácido nucleico total se aísla de la célula de origen, (2) no está unida a todo o una parte de un polinucleótido al cual la "molécula de ácido nucleico aislada" está unida en la naturaleza, (3) está operativamente unida a un polinucleótido con el cual no está relacionada en la naturaleza, o (4) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia de polinucleótidos más grande. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención está sustancialmente libre de cualquier contaminación de otras moléculas de ácidos nucleicos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que pudieran interferir con su uso en la producción del polipéptido o su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación.

El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido de la invención que (1) se ha separado de al menos el 50 por ciento de los polinucleótidos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los cuales éste se encuentra de forma natural cuando se aísla de la célula de origen, (2) no está unido (ni mediante interacción covalente ni no covalente) a todo o una parte de un polipéptido al cual el "polipéptido aislado" se une en la naturaleza, (3) está unido operativamente (mediante interacción covalente o no covalente) a un polipéptido con el cual no está relacionado en la naturaleza, o (4) no se produce en la naturaleza. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de cualquier contaminación de otros polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que pudiera interferir con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, o de investigación.

El término "vector" se usa para referirse a cualquier molécula (*por ejemplo*, ácido nucleico, plásmido o virus) utilizados para transferir información codificante a una célula huésped.

El término "vector de expresión" se refiere a un vector que es apropiado para la transformación de una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión secuencias de ácidos nucleicos heterólogos insertados. La expresión incluye, pero no se limita a, procesos tales como transcripción, traducción y empalme de ARN, si los intrones están presentes.

El término "célula huésped" se usa para referirse a una célula que se ha transformado, o es susceptible de ser transformada con una secuencia de ácido nucleico y luego expresar un gen seleccionado de interés. El término incluye a la progenie de la

7

célula parental, sea o no la progenie idéntica en morfología o estructura genética al parental original, siempre y cuando el gen seleccionado esté presente.

El término "de origen natural" cuando se usa con relación a los materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped, y similares, se refiere a los materiales que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados por el hombre. Igualmente, "de origen no natural" como se usa en la presente, se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido estructuralmente modificado o sintetizado por el hombre. Cuando se usa en relación con los nucleótidos, el término "de origen natural" se refiere a las bases adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), y uracilo (U). Cuando se usa en relación con los aminoácidos, el término "de origen natural" se refiere a los 20 aminoácidos alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptófano (W), y tirosina (Y).

El término "polipéptido FGF21" se refiere a cualquier polipéptido natural de tipo salvaje expresado en humanos. Para los propósitos de esta solicitud, el término "polipéptido FGF21" se puede utilizar indistintamente para referirse al polipéptido FGF21 de longitud completa, el cual consiste de 209 residuos de aminoácidos (sec. con núm. de ident.: 2) y la cual es codificada por la secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 1, y la forma madura del polipéptido, que consiste de 181 residuos de aminoácidos (sec. con núm. de ident.: 4), la cual es codificada por la secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 3, y en la que los 28 residuos de aminoácidos del extremo amino-terminal del polipéptido FGF21 de longitud completa (*es decir*, los cuales constituyen el péptido señal) se han eliminado. Un polipéptido FGF21 se puede expresar con o sin un residuo de metionina N-terminal, según se nota en este documento, un residuo metionina N-terminal se puede añadir mediante diseño o como una función de un sistema de expresión bacteriano.

El término "biológicamente activo", según se aplica a un polipéptido FGF21, incluyendo los polipéptidos mutantes FGF21 descritos en este documento, se refiere a una actividad natural de un polipéptido FGF21 tipo salvaje, tal como la capacidad de reducir la glucosa, la insulina, los triglicéridos o el colesterol en sangre, reducir el peso corporal y mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto energético, o la sensibilidad a la insulina. Tal como se aplica a un polipéptido mutante FGF21, el término no depende del tipo o número de modificaciones que se hayan introducido en el polipéptido mutante FGF21. Por ejemplo, algunos polipéptidos mutantes FGF21 poseen un nivel algo disminuido de la actividad FGF21 relativa a la del polipéptido FGF21 tipo salvaje, pero sin embargo se

19

consideran biológicamente activos los polipéptidos mutantes de FGF21. Las diferencias en la actividad de un polipéptido mutante FGF21 particular se puede observar entre ensayos *in vivo* e *in vitro*; cualquiera de esas diferencias se relaciona con el ensayo particular utilizado. Esta observación, sin embargo, no afecta al significado del término "biológicamente activo", y los polipéptidos mutantes FGF21 que muestran una actividad natural de un polipéptido FGF21 tipo salvaje, tal como la capacidad para reducir la glucosa, la insulina, los triglicéridos, o el colesterol, reducir el peso corporal y mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto energético, o la sensibilidad a la insulina, en cualquier ensayo *in vivo* o *in vitro* son "biológicamente activos."

Los términos "cantidad efectiva" y "cantidad terapéuticamente efectiva" se utilizan indistintamente y se refieren a la cantidad de un polipéptido mutante de FGF21 utilizada para apoyar un nivel observable de una o más actividades biológicas del polipéptido FGF21 de tipo salvaje, tal como la capacidad de reducir la glucosa, la insulina, los triglicéridos o los niveles de colesterol; reducir el peso corporal; o mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto energético, o la sensibilidad a la insulina.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable" como se utiliza en este documento, se refiere a uno o más materiales de formulación apropiados para lograr o mejorar la administración de un polipéptido mutante FGF21. Ejemplos de tales materiales se pueden encontrar en *Remington, supra*, incorporados en este documento como referencia.

El término "molécula anclada" se refiere a una construcción que comprende dos o más moléculas de FGF21 unidas entre sí mediante una molécula enlazadora. Una molécula anclada comprende al menos dos polipéptido FGF21, al menos uno de los cuales es un polipéptido mutante FGF21 como se describe en este documento, pero puede comprender tres, cuatro o más polipéptidos FGF21 o polipéptidos mutantes FGF21 unidos mediante enlazadores. De esta manera, el término molécula anclada no se limita a una molécula que comprende una combinación de sólo un o dos polipéptidos FGF21 o polipéptidos mutantes FGF21.

El término "sitio de unión al polímero" se refiere a una región de la secuencia primaria de aminoácidos de un polipéptido (*por ejemplo*, un polipéptido FGF21) que es químicamente adaptable para la asociación covalente con un polímero (*por ejemplo*, moléculas de PEG de todos los pesos moleculares, manosa polimérica, glicanos, etc.). Un sitio de unión al polímero puede significar un aminoácido simple (*por ejemplo*, lisina, cisteína, arginina o un aminoácido apropiado no natural) o el término puede referirse a dos o más aminoácidos que son adyacentes el uno al otro, ya sea en secuencia o en espacio.

11a

El término " modificado químicamente," cuando se usa en relación con un polipéptido FGF21 de tipo salvaje o un polipéptido mutante FGF21 como se describe en este documento, se refiere a un polipéptido FGF21 que ha sido modificado a partir de su estado natural mediante la unión covalente de una o más moléculas heterólogas. Los ejemplos de moléculas heterólogas incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, óxido de propileno/etileno, óxido de co-polímeros, polioles polioxietilados, hidroxietilo de almidón (HES), y del alcohol de polivinilo. Los ejemplos de polipéptidos FGF21 modificados químicamente incluyen los polipéptidos pegilados de tipo salvaje FGF21 y los polipéptidos pegilados FGF21 mutantes.

2. Polipéptidos mutantes FGF21

En varios aspectos, la presente invención describe una serie de métodos para la PEGilación sitio-dirigida de los polipéptidos FGF21 y FGF21 mutantes, los cuales pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas de la molécula de FGF21 y reducir al mínimo el impacto sobre la actividad *in vitro*. El perfil farmacocinético mejorado de estas moléculas de FGF21 pegiladas tiene un impacto en la eficacia *in vivo* de la molécula mediante el incremento de la exposición al agente terapéutico. Además, las estrategias descritas en este documento son compatibles con la creación de sitios de PEGilación múltiples, los cuales pueden mejorar adicionalmente las propiedades farmacocinéticas de la molécula, y reducir su potencial de formación de vacuolas. Dos estrategias principales se emplearon para ello, según lo descrito en este documento.

En un aspecto, la presente invención se refiere a secuencias de FGF21 en las cuales se han introducido una o más modificaciones. Por lo tanto, los términos "polipéptido mutante FGF21" y "FGF21 mutante", los cuales se pueden usar indistintamente, se refieren a un polipéptido FGF21 en el cual una secuencia de aminoácidos FGF21 de tipo salvaje (*por ejemplo*, las sec. con núm. de ident. 2 ó 4) se ha modificado. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, una o más sustituciones de aminoácidos, incluyendo sustituciones con análogos de aminoácidos de origen no natural, inserciones y truncamientos. Por lo tanto, los mutantes del polipéptido FGF21 incluyen, pero no se limitan a, mutantes sitio dirigidos de FGF21, tales como aquellos que introducen un sitio no natural de unión del polímero, o los cuales le confieren un grado de resistencia a la proteólisis, como se describe en este documento. A los efectos de la identificación de las sustituciones de aminoácidos específicas de los mutantes FGF21 de la invención, la numeración de los residuos de aminoácidos truncados o mutados corresponde a la de los 181 residuos del polipéptido FGF21 maduro (*a saber*, el N-terminal de la secuencia comienza con HPIPD, y estos residuos son designados

20

como los residuos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). Un residuo de metionina en el N-terminal puede, pero no necesita estar presente; este residuo de metionina en el N-terminal no está incluido en el esquema de numeración de la proteína.

Según se ha indicado, los mutantes FGF21, incluyendo las formas truncadas de FGF21 que comprenden una o más sustituciones o inserciones las cuales comprenden aminoácidos no naturales, constituyen una modalidad de la presente invención. Estas inserciones o sustituciones pueden impartir varias propiedades, incluyendo la acción como sitios para la unión al polímero. En tales casos, los aminoácidos no naturales se pueden incorporar en una secuencia de FGF21, además de las distintas mutaciones descritas en este documento. Por consiguiente, un mutante FGF21 puede comprender una o más de las mutaciones descritas en este documento y además puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. Una lista no-limitativa de ejemplos de aminoácidos no naturales que se pueden insertar en una secuencia de FGF21 o se pueden sustituir por un residuo de tipo salvaje en una secuencia de FGF21 incluyen β -aminoácidos, homo-aminoácidos, aminoácidos cíclicos y aminoácidos con cadenas laterales derivatizadas. Los ejemplos incluyen (en forma de L o en forma de D; abreviadas como en los paréntesis): para-acetil-fenilalanina, para-azido-fenilalanina, para-bromo-fenilalanina, para-iodo-fenilalanina, para-etinil-fenilalanina, citrulina (Cit), homocitrulina (hCit), $N\alpha$ -metilcitrulina (NMeCit), $N\alpha$ -metilhomocitrulina ($N\alpha$ -MeHoCit), ornitina (Orn), $N\alpha$ -Metilornitina ($N\alpha$ -MeOrn o NMeOrn), sarcosina (Sar), homolisina (hLys o hK), homoarginina (hArg o hR), homoglutamina (hQ), $N\alpha$ -metilarginina (NMeR), $N\alpha$ -metilleucina ($N\alpha$ -MeL o NMeL), N-metilhomolisina (NMeHoK), $N\alpha$ -metilglutamina (NMeQ), norleucina (Nle), norvalina (Nva), 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (Tic), ácido octahidroindol-2-carboxílico (Oic), 3-(1-naftil)alanina (1-Nal), 3-(2-naftil)alanina (2-Nal), 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (Tic), 2-indanilglicina (IgI), para-iodofenilalanina (pI-Phe), para-aminofenilalanina (4AmP o 4-Amino-Phe), 4-guanidino fenilalanina (Guf), glicillisina (abreviada "K(N ϵ -glicil)" o "K(glicil)" o "K(gli)"), nitrofenilalanina (nitrophe), aminofenilalanina (aminophe o Amino-Phe), bencilfenilalanina (bencilphe), ácido γ -carboxiglutámico (γ -carboxiglu), hidroxiprolina (hidroxipro), p-carboxil-fenilalanina (Cpa), ácido α -aminoadípico (Aad), $N\alpha$ -metil valina (NMeVal), N- α -metil leucina (NMeLeu), $N\alpha$ -metilnorleucina (NMeNle), ciclopentilglicina (Cpg), ciclohexilglicina (Chg), acetilarginina (acetilarg), ácido α , β -diaminopropiónico (Dpr), ácido α , γ -diaminobutírico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dap), ciclohexilalanina (Cha), 4-metil-fenilalanina (MePhe), β , β -difetil-alanina (BiPhA), ácido aminobutírico (Abu), 4-fenil-fenilalanina (o bifenilalanina; 4Bip), ácido α -amino-isobutírico (Aib), beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido piperidínico, ácido aminocaprioico, ácido aminoheptanoico, ácido aminopimélico, desmosina, ácido diaminopimélico, N-etilglicina,

21

N-etilaspargina, hidroxilisina, alo--hidroxilisina, isodesmosina, alo--isoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, 4-hidroxiprolina (Hyp), γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ω -metilarginina, ácido 4-amino-O-ftálico (4APA), y otros aminoácidos similares, y formas derivadas de cualquiera de aquellos enumerados específicamente.

En otras realizaciones de la presente invención, un polipéptido mutante de FGF21 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 por ciento idéntica a una secuencia de aminoácidos de FGF21 de tipo salvaje (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.: 2 ó 4), pero en el cual los residuos específicos que introducen sitios de unión al polímero de origen no naturales en el polipéptido mutante FGF21 no se han modificado adicionalmente. En otras palabras, con la excepción de los residuos en la secuencia mutante de FGF21 que se han modificado con el objetivo de introducir un sitio de unión al polímero no natural o una mutación para aumentar la resistencia a la proteólisis, el 15 por ciento de todos los otros residuos de aminoácidos en la secuencia mutante de FGF21 puede modificarse. Por ejemplo, en el polipéptido G170C mutante de FGF21, puede modificarse hasta el 15 por ciento de todos los residuos de aminoácidos que no sean el residuo de glicina en la posición 170. Aún en otras realizaciones, un polipéptido mutante FGF21 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 90 por ciento, o aproximadamente 95, 96 97, 98 ó 99 por ciento idéntica a una secuencia de aminoácidos de FGF21 de tipo salvaje (*por ejemplo*, secs. con núm. de ident.: 2, 4, 6 u 8), pero en el cual los residuos específicos que se han modificado para introducir un sitio de unión al polímero no natural o para mejorar la resistencia a la proteólisis no se han modificado adicionalmente. Tales polipéptidos mutantes FGF21 poseen al menos una actividad del polipéptido FGF21 de tipo salvaje.

Los polipéptidos mutantes FGF21 se pueden generar por la introducción de sustituciones de aminoácidos, ya sean conservadoras o no conservadoras en la naturaleza, y usando aminoácidos naturales o no naturales, en posiciones particulares del polipéptido FGF21. Estas sustituciones se pueden hacer, además de las sustituciones diseñadas u observadas para impartir una propiedad deseable al polipéptido FGF21. A modo de ejemplo, un polipéptido mutante FGF21 puede comprender una sustitución diseñada para lograr una propiedad deseable, tal como la introducción de un sitio de unión al polímero no natural o la mejora de la resistencia a la proteólisis, y además puede comprender una o más sustituciones conservadoras o no conservadoras, las cuales pueden, pero no necesitan, mantener la actividad biológica del polipéptido FGF21 de tipo salvaje.

Las mutaciones de FGF21 pueden ser conservadoras o no conservadoras. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" puede involucrar una sustitución de un

22

residuo de aminoácido nativo (*por ejemplo*, un residuo que se encuentra en una posición determinada en la secuencia del polipéptido FGF21 de tipo salvaje) con un residuo no nativo (*es decir*, un residuo que no se encuentra en una posición determinada de la secuencia del polipéptido FGF21 de tipo salvaje), de manera que hay poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga de los residuos de aminoácidos en esa posición. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos también comprenden residuos de aminoácidos no naturales los cuales se incorporan típicamente mediante síntesis química de péptidos en vez de mediante la síntesis de los sistemas biológicos. Estas incluyen peptidomiméticos, y otras formas invertidas o revertidas de las porciones de aminoácidos.

Los residuos de origen natural se pueden dividir en clases basado en las propiedades de la cadena lateral común

- (1) hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutrales: Cys, Ser, Thr;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) residuos que tienen influencia en la orientación de la cadena: gli, Pro; y
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones conservadoras pueden involucrar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro miembro de la misma clase. Las sustituciones no conservadoras pueden involucrar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

Las sustituciones de aminoácidos deseadas (sean conservadoras o no conservadoras) se pueden determinar por aquellos expertos en la materia en el momento en que se deseen tales sustituciones. Una lista ejemplar (pero no limitante) de sustituciones de aminoácidos se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1
Sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gli	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

2.A. Polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden una mutación resistente a la proteólisis

Se ha determinado que la forma madura de FGF21 (*es decir*, la forma de 181 residuos) sufre la degradación *in vivo*, lo que se determinó últimamente que surge del ataque proteolítico. Se encontró que la degradación *in vivo* del FGF21 maduro conduce a una vida media efectiva más corta, lo cual puede afectar negativamente el potencial terapéutico de la molécula. Correspondientemente, se realizó un estudio dirigido para identificar mutantes FGF21 que presentaran una resistencia a la proteólisis. Como resultado de esta investigación, los sitios en el polipéptido FGF21 maduro que se habían determinado como particularmente susceptibles a la proteólisis, incluyeron el enlace peptídico entre los residuos de aminoácidos en las posiciones 4-5, 20-21, 151-152 y 171-172.

Una lista no limitativa de sustituciones ejemplares que eliminan el efecto proteolítico observado en el FGF21 maduro sin afectar la actividad biológica de la proteína a un grado inaceptable, que se pueden emplear en la presente invención, se presenta en la Tabla 2. La Tabla 2 es demostrativa solamente, y otras sustituciones resistentes a la proteólisis se pueden identificar y emplear en la presente invención. Estas sustituciones resistentes a la proteólisis se pueden hacer, además de las sustituciones que introducen uno o más sitios de unión a los polímeros no naturales, lo que genera un

22

polipéptido mutante FGF21 que exhibe las características deseables impartidas por cada tipo de mutación.

Tabla 2

Sustituciones representativas que proporcionan resistencia a la proteólisis

Posición del aminoácido	Residuo nativo	Mutaciones
19	Arg	Gln, Ile, Lys
20	Tyr	His, Leu, Phe
21	Leu	Ile, Phe, Tyr, Val
22	Tyr	Ile, Phe, Val
150	Pro	Ala, Arg
151	Gli	Ala, Val
152	Ile	His, Leu, Phe, Val
170	Gli	Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Pro, Ser
171	Pro	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, gli, His, Lys, Ser, Thr, Trp, Tyr
172	Ser	Leu, Thr
173	Gln	Arg, Glu

Preferiblemente, pero no necesariamente, los polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden una mutación resistente a la proteólisis, tienen esencialmente la misma o una actividad biológica superior a la del FGF21 de tipo salvaje. Por lo tanto, otra modalidad de la presente invención se dirige a los polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden uno o más sitios de unión a los polímeros no naturales y son resistentes a la proteólisis, y aún así mantienen la misma o una actividad biológica superior a la del FGF21 de tipo salvaje. Aunque menos deseable, en algunos casos, los mutantes FGF21 que comprenden uno o más sitios de unión a los polímeros no naturales y son resistentes a la proteólisis pero que exhiben cierta disminución en la actividad biológica, forman otra modalidad de la invención. En algunos casos puede ser deseable mantener un cierto grado de proteólisis, y, en consecuencia, los mutantes FGF21 que comprenden uno o más sitios de unión a los polímeros no naturales y que son resistentes a la proteólisis y aún así permiten que se produzca un cierto grado de proteólisis, también constituyen otra modalidad de la presente invención.

Al igual que con todos los polipéptidos mutantes FGF21 de la invención, los polipéptidos mutantes FGF21 resistentes a la proteólisis que comprenden uno o más sitios de unión a los polímeros no naturales, se pueden preparar como se describe en el presente documento. Aquellos con habilidades ordinarias en la materia, por ejemplo, aquellos familiarizados con las técnicas estándares de biología molecular, pueden emplear ese conocimiento, conjuntamente con la presente descripción, para preparar y usar los mutantes FGF21 resistentes a la proteólisis que comprenden uno o más sitios de unión al polímero que no son de origen natural de la presente invención. Se pueden usar técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejidos, y

25

transformación (*por ejemplo*, electroporación, lipofección). *Ver, por ejemplo*, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, el cual se incorpora en la presente como referencia para cualquier propósito. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes, como se logra habitualmente en la materia, o como se describe en la presente. A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas y procedimientos de laboratorio de, la química analítica, la química orgánica sintética, y la química médica y farmacéutica descritas en la presente son aquellas bien conocidas y habitualmente usadas en la materia. Se pueden usar técnicas estándares para las síntesis químicas; análisis químicos; preparación, formulación y administración de productos farmacéuticos; y tratamiento de pacientes.

Los mutantes FGF21 resistentes a la proteólisis, que comprenden uno o más sitios de unión al polímero no-natural, los cuales son resistentes a la proteólisis, se pueden modificar químicamente usando la metodología conocida en la técnica y descrita en este documento. La modificación química (*por ejemplo*, la PEGilación) de un polipéptido mutante FGF21 resistente a la proteólisis, que comprende uno o más sitios de unión al polímero no-natural, puede generar moléculas que presentan tanto resistencia a la proteólisis como propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas deseables.

20 2.B. Polipéptidos mutantes de FGF21 que comprenden un sitio no-natural de unión al polímero

En varios aspectos de la presente invención, se divulgan los polipéptidos mutantes FGF21. En otro aspecto, los polipéptidos mutantes FGF21 de la presente invención incluyen polipéptidos FGF21 en los cuales se han introducido (sitio)s de unión al polímero no naturales (*por ejemplo*, PEGilación). En otro aspecto de la presente invención, se divulgan formas truncadas de los polipéptidos mutantes FGF21, en los cuales se han introducido (sitio)s de unión al polímero no naturales (*por ejemplo*, PEG). Los polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden un sitio de unión al polímero no natural y una o más sustituciones conservadoras o no conservadoras, los cuales pueden pero no necesitan mantener la actividad biológica del FGF21 de tipo salvaje, forman otro aspecto de la invención. Los diversos mutantes del polipéptido FGF21 de la invención se pueden preparar como se describe a continuación y en las referencias proporcionadas en este documento.

En una modalidad, los mutantes del polipéptido FGF21 de la presente invención se modifican mediante la introducción de un sitio de unión al polímero no-natural. De hecho, en uno de los aspectos, éste es uno de los objetivos de los mutantes FGF21 de la invención, es decir, la introducción de uno o más sitios de unión no natural de los polímeros, de

26

manera tal que los polímeros que prolongan su vida media se pueden unir al polipéptido mutante FGF21 en las localizaciones deseadas. El polímero seleccionado es típicamente, aunque no necesariamente, soluble en agua, de manera que la proteína a la cual se une no precipita en un medio acuoso, tal como un entorno fisiológico. Incluidos dentro del
5 alcance de los polímeros apropiados está una mezcla de polímeros. Preferiblemente, para el uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable, tal como el PEG con un peso molecular apropiado. Los polímeros no solubles en agua, tales como copolímeros en bloque PEG de ácidos grasos también pueden conjugarse con los mutantes del polipéptido FGF21 de la invención y
10 constituyen un aspecto de la invención.

La actividad de los polipéptidos mutantes FGF21 de la presente invención se puede analizar mediante una variedad de vías, por ejemplo, usando un ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa como se describe en el Ejemplo 10 de esta solicitud.

La actividad de los polipéptidos mutantes FGF21 de la invención también se
15 puede evaluar en un ensayo *in vivo*, tal como con ratones ob/ob, como se muestra en el Ejemplo 12. Generalmente, para evaluar la actividad *in vivo* de uno o más de estos polipéptidos, el polipéptido se puede administrar a un animal de prueba por vía intraperitoneal. Después de uno o más períodos de tiempo deseados, se puede extraer una muestra de sangre y se pueden medir los niveles de glucosa en sangre.

20 Al igual que con todos los polipéptidos mutantes FGF21 de la invención, estos polipéptidos opcionalmente pueden incluir un residuo de metionina amino-terminal, que puede introducirse mediante mutación dirigida, o como resultado de un proceso de expresión bacteriana.

Los polipéptidos mutantes FGF21 de la presente invención se pueden preparar
25 como se describe en el Ejemplo 7. Aquellos con habilidades ordinarias en la materia, familiarizados con las técnicas de biología molecular estándares, pueden emplear ese conocimiento, conjuntamente con la presente descripción, para preparar y usar los polipéptidos mutantes FGF21 de la presente invención. Se pueden usar técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejidos, y
30 transformación (*por ejemplo*, electroporación, lipofección). *Ver, por ejemplo*, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, el cual se incorpora en la presente como referencia para cualquier propósito. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes, como se logra habitualmente en la materia, o como se describe en la presente. A menos que se
35 proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas y procedimientos de laboratorio de, la química analítica, la química orgánica sintética, y la química médica y farmacéutica descritas en la presente son aquellas bien

22

conocidas y habitualmente usadas en la materia. Se pueden usar técnicas estándares para las síntesis químicas; análisis químicos; preparación, formulación y administración de productos farmacéuticos; y tratamiento de pacientes.

5 Luego de la preparación de un polipéptido mutante FGF21, el polipéptido puede modificarse químicamente mediante la unión de un polímero, como se describe en este documento en el Ejemplo 9.

3. Polipéptidos mutantes FGF21 truncados que comprenden un sitio de unión al polímero de origen no natural

10 Una modalidad de la presente invención está dirigida a las formas truncadas de un mutante del polipéptido FGF21, que comprende uno o más sitios de unión al polímero de origen no natural. Tales polipéptidos mutantes truncados pueden, aunque no es necesario, modificarse químicamente.

15 Tal como se usa en este documento, el término "polipéptido mutante FGF21 truncado" se refiere a un polipéptido mutante FGF21 o un polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente en el cual uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado del extremo amino-terminal (o N-terminal) del polipéptido FGF21, uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado del extremo carboxilo-terminal (o C-terminal) del polipéptido mutante FGF21 o del polipéptido FGF21 modificado químicamente, o uno o
20 más residuos de aminoácidos se han eliminado tanto de los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido mutante FGF21 o de los polipéptidos FGF21 modificados químicamente.

La actividad de las moléculas mutantes FGF21 truncadas en el N-terminal, los mutantes FGF21 truncados en el C-terminal y de los mutantes FGF21 truncados tanto en
25 el N-terminal como en el C-terminal de la molécula, así como las formas modificadas químicamente de estos mutantes, se puede evaluar mediante un variedad de vías, por ejemplo, usando un ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa como se describe en este documento en el Ejemplo 10.

La actividad de los mutantes truncados de los polipéptidos FGF21 y de los
30 mutantes truncados de los polipéptidos FGF21 modificados químicamente de la presente invención, también se puede evaluar en un ensayo *in vivo*, tal como en ratones ob/ob, como se muestra en el Ejemplo 12. Generalmente, para evaluar la actividad *in vivo* de uno o más de estos polipéptidos, el polipéptido se puede administrar a un animal de prueba por vía intraperitoneal. Después de uno o más períodos de tiempo deseados, se puede
35 extraer una muestra de sangre y se pueden medir los niveles de glucosa en sangre.

Al igual que con todos los mutantes FGF21 de la presente invención, los polipéptidos mutantes truncados de FGF21 y los mutantes truncados modificado

76

químicamente, pueden comprender opcionalmente un residuo de metionina amino-terminal, que puede introducirse mediante mutación dirigida o como resultado de un proceso de expresión bacteriana.

Los polipéptidos mutantes FGF21 truncados de la presente invención se pueden preparar como se describe en el Ejemplos 7. Aquellos con habilidades ordinarias en la materia, familiarizados con las técnicas de biología molecular estándares, pueden emplear ese conocimiento, conjuntamente con la presente descripción, para preparar y usar los polipéptidos mutantes FGF21 truncados de la presente invención. Se pueden usar técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejidos, y transformación (*por ejemplo*, electroporación, lipofección). Ver, *por ejemplo*, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, el cual se incorpora en la presente como referencia para cualquier propósito. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes, como se logra habitualmente en la materia, o como se describe en la presente.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas y procedimientos de laboratorio de la química analítica, la química orgánica sintética, y la química médica y farmacéutica descritas en la presente son aquellas bien conocidas y habitualmente usadas en la materia. Se pueden usar técnicas estándares para las síntesis químicas; análisis químicos; preparación, formulación y administración de productos farmacéuticos; y tratamiento de pacientes.

Luego de la preparación de un polipéptido mutante FGF21, el polipéptido puede modificarse químicamente mediante la unión de un polímero, como se describe en el Ejemplo 9.

4. Polipéptidos mutantes FGF21 del C-terminal y encapuchados.

En otra modalidad, la presente invención está dirigida a polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden uno o más sitios de unión a los polímeros no naturales que se han encapuchado mediante la adición de otro u otros residuos al C-terminal del polipéptido, extendiendo la secuencia de aminoácidos más allá de la secuencia de la proteína de tipo salvaje. En aún otra modalidad, la presente invención está dirigida a polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden uno o más sitios de unión a los polímeros no naturales y que además comprende una o más mutaciones del C-terminal. Estos polipéptidos mutantes FGF21 encapuchados y mutados en el C-terminal pueden, aunque no es necesario, modificarse químicamente.

Como se usa en este documento, el término " polipéptido mutante FGF21 encapuchado" se refiere a un polipéptido mutante FGF21 o polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente en los cuales uno o más residuos de aminoácidos se han

29

añadido al C terminal del polipéptido mutante FGF21 o polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente. Cualquier aminoácido de origen natural o no natural puede usarse para proteger un polipéptido mutante FGF21, incluyendo uno o más residuos de prolina y uno o más residuos de glicina. Aunque la secuencia de FGF21 tipo salvaje es solamente de 181 residuos de longitud, un polipéptido mutante FGF21 encapuchado extiende la longitud del polipéptido un residuo por cada residuo de la caperuza añadido, en consistencia con el esquema de numeración de la presente descripción, los residuos de la caperuza se numeran empezando por 182. Por lo tanto, un único residuo de prolina de la caperuza se indica como P182. Son posibles caperuzas más grandes y se numeran correspondientemente (por ejemplo, X182, Y183, Z184, donde X, Y y Z son cualquier aminoácido de origen natural o no natural). Los residuos de encapuchado se pueden añadir a un polipéptido mutante FGF21 usando cualquier método conveniente, tal como por vía química, en el cual un aminoácido se une covalentemente al C-terminal del polipéptido mediante una reacción química. Alternativamente, un codón que codifica un residuo de la caperuza se puede añadir a la secuencia codificante del polipéptido mutante FGF21 usando técnicas estándares de biología molecular. Cualquiera de los polipéptidos mutantes FGF21 descritos en este documento, pueden ser encapuchados con uno o más residuos, según lo deseado.

Las mutaciones del C-terminal forman otro aspecto de la invención. Como se usa en este documento, el término "mutación del C-terminal" se refiere a uno o más cambios en la región de los residuos 91-181 (o mayor si el polipéptido es encapuchado) de un polipéptido mutante FGF21. Una mutación del C-terminal introducida en la secuencia del polipéptido mutante FGF21 será adicional a una o más mutaciones que introducen un sitio de unión al polímero de origen no natural. Aunque las mutaciones del C-terminal se pueden introducir en cualquier punto de la región de 91-181 de la secuencia del polipéptido mutante FGF21, las posiciones ejemplares para las mutaciones del C-terminal incluyen las posiciones 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180 y 181. Las mutaciones del C-terminal se pueden introducir usando las técnicas estándares de biología molecular, tales como las descritas en este documento. Cualquiera de los polipéptidos mutantes FGF21 descritos en este documento puede comprender una mutación del C-terminal.

Los ejemplos de posiciones e identidades para las mutaciones del C-terminal y/o encapuchados se muestran en la Tabla 3:

TABLA 3

Ejemplos de posiciones de encapuchados y/o mutaciones en el C-terminal

E37C, R77C, P171G, P182
P171G, S181P, P182
P171G, S181P
P171G, S181T
P171G, S181G
P171G, S181A
P171G, S181L
P171G, A180P
P171G, A180G
P171G, A180S
P171G, Y179P
P171G, Y179G
P171G, Y179S
P171G, Y179A
P171G, L182
P171G, G182
P171G, P182
P171G, G182, G183
P171G, G182, G183, G184, G185, G186

La actividad de los polipéptidos mutantes FGF21 encapuchados y/o mutados en el C-terminal, así como las formas modificadas químicamente de estos mutantes, se puede analizar mediante una variedad de vías. por ejemplo, usando un ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa como se describe en este documento en el Ejemplo 10.

La actividad de los polipéptidos mutantes FGF21 encapuchados y/o mutados en el C-terminal, y de los polipéptidos mutantes FGF21 encapuchados y/o mutados en el C-terminal y modificados químicamente de la presente invención, también se puede evaluar en un ensayo *in vivo*, tal como en ratones ob/ob, como se muestra en el Ejemplo 12. Generalmente, para evaluar la actividad *in vivo* de uno o más de estos polipéptidos, el polipéptido se puede administrar a un animal de prueba por vía intraperitoneal. Después de uno o más períodos de tiempo deseados, se puede extraer una muestra de sangre y se pueden medir los niveles de glucosa en sangre.

Al igual que con todos los mutantes FGF21 de la invención, los polipéptidos mutantes FGF21 encapuchados y/o mutados en el C-terminal, y los polipéptidos mutantes FGF21 encapuchados y/o mutados en el C-terminal y modificados químicamente, opcionalmente pueden comprender un residuo de metionina amino-terminal, el cual se puede introducir por mutación dirigida o como resultado de un proceso de expresión bacteriana.

Los polipéptidos mutantes FGF21 encapuchados y/o mutados en el C-terminal de la presente invención se pueden preparar como se describe en el Ejemplo 7. Aquellos con habilidades ordinarias en la materia, familiarizados con las técnicas de biología molecular

21

estándares, pueden emplear ese conocimiento, conjuntamente con la presente descripción, para preparar y usar los polipéptidos mutantes FGF21 encapuchados y/o mutados en el C-terminal de la presente invención. Se pueden usar técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejidos, y transformación (*por ejemplo*, electroporación, lipofección). Ver, *por ejemplo*, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, el cual se incorpora en la presente como referencia para cualquier propósito. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes, como se logra habitualmente en la materia, o como se describe en la presente. A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas y procedimientos de laboratorio de, la química analítica, la química orgánica sintética, y la química médica y farmacéutica descritas en la presente son aquellas bien conocidas y habitualmente usadas en la materia. Se pueden usar técnicas estándares para las síntesis químicas; análisis químicos; preparación, formulación y administración de productos farmacéuticos; y tratamiento de pacientes.

Luego de la preparación de un polipéptido mutante FGF21 encapuchado y/o mutado en el C-terminal, el polipéptido puede ser modificado químicamente mediante la unión de un polímero, como se describe en el Ejemplo 9.

5. Polipéptidos mutantes FGF21 que contienen residuos de cisteína de origen no natural

En otro aspecto de la presente invención, los polipéptidos mutantes FGF21 se pueden preparar de manera que ambos residuos de cisteína en la secuencia del polipéptido FGF21 de tipo salvaje se sustituyen por residuos que no forman enlaces disulfuro, tales como la alanina o serina, y no sirven como sitios de unión al polímero. Posteriormente, se pueden hacer sustituciones en la secuencia del polipéptido mutante FGF21 que introducen sitios de unión al polímero de origen no natural, en forma de residuos que contienen tiol (*por ejemplo*, residuos de cisteína o aminoácidos de origen no natural que tienen grupos tiol) o grupos amino libres (*por ejemplo*, residuos de lisina o arginina o aminoácidos que tienen grupos amino libres de origen no natural). Los polímeros que se basan en grupos aminos libre o tioles para la unión, tales como el PEG, pueden entonces dirigirse a los residuos de cisteína, lisina o arginina que se han introducido en la secuencia del polipéptido mutante FGF21 en las posiciones conocidas. Esta estrategia puede facilitar la colocación más eficiente y controlada del polímero.

En un enfoque, los dos residuos de cisteína de origen natural en el polipéptido FGF21 de tipo salvaje, los cuales se encuentran localizados en las posiciones 75 y 93, se pueden sustituir con residuos que no contienen tioles. Posteriormente, un residuo de

32

cisteína se puede introducir en una ubicación conocida. El polipéptido mutante FGF21 puede comprender también otras mutaciones, las cuales pueden introducir aún más sitios de unión al polímero (*por ejemplo*, residuos de cisteína) o pueden ser diseñadas para lograr alguna otra propiedad deseada. Ejemplos de tales polipéptidos mutantes FGF21 incluyen C75A/E91C/C93A/H125C/P171G y C75S/E91C/C93S/H125C/P171G. En estos ejemplos, las cisteínas de origen natural en las posiciones 75 y 93 se mutaron a residuos de alanina o serina, los sitios de unión al polímero se introdujeron en las posiciones 91 y 125 (en este caso para un polímero reactivo con tiol, tal como el PEG) y se hizo una mutación adicional en la posición 171, a saber, la sustitución de la prolina 171 con un residuo de glicina.

Al igual que todos los polipéptidos mutantes FGF21 divulgados en este documento, la actividad de los polipéptidos mutantes FGF21 los cuales no contienen ninguna de las cisteínas que se encuentran en la secuencia del polipéptido de tipo salvaje FGF21, sino que en su lugar comprenden un sitio de unión al polímero introducido y, opcionalmente, una o más mutaciones adicionales, así como formas modificadas químicamente de estos mutantes, se puede evaluar mediante un variedad de vías, por ejemplo, usando un ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa como se describe en este documento en el Ejemplo 10. La actividad *in vivo* de estos polipéptidos se puede evaluar en un ensayo *in vivo*, tal como con ratones ob/ob, como se muestra en el Ejemplo 12 y como se describe en el presente documento.

Al igual que con todos los mutantes FGF21 de la invención, la actividad de los polipéptidos mutantes FGF21 los cuales no contienen ninguna de las cisteínas que se encuentran en la secuencia del polipéptido de tipo salvaje FGF21, sino que constituyen un sitio de unión al polímero introducido y, opcionalmente, uno o más mutaciones adicionales y formas modificadas químicamente de estos polipéptidos mutantes FGF21, opcionalmente pueden comprender un residuo de metionina amino-terminal, el cual puede introducirse mediante mutación dirigida o como resultado de un proceso de expresión bacteriana.

Los polipéptidos mutantes FGF21 que no contienen ninguna de las cisteína encontradas en la secuencia del polipéptido FGF21 salvaje pero en su lugar comprende un sitio de unión al polímero introducido y opcionalmente una o más mutaciones adicionales, se pueden preparar como es descrito en la presente, por ejemplo en el Ejemplo 7. Aquellos con habilidades ordinarias en la materia, familiarizados con las técnicas de biología molecular estándares, pueden emplear ese conocimiento, conjuntamente con la presente descripción, para preparar y usar esos polipéptidos mutantes FGF21. Se pueden usar técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejidos, y transformación (*por ejemplo*, electroporación, lipofección). Ver, *por ejemplo*,

Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, el cual se incorpora en la presente como referencia para cualquier propósito. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes, como se logra habitualmente en la materia, o como se describe en la presente.

- 5 A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas y procedimientos de laboratorio de, la química analítica, la química orgánica sintética, y la química médica y farmacéutica descritas en la presente son aquellas bien conocidas y habitualmente usadas en la materia. Se pueden usar técnicas estándares para las síntesis químicas; análisis químicos; preparación, formulación y
10 administración de productos farmacéuticos; y tratamiento de pacientes.

Luego de la preparación de los polipéptidos mutantes FGF21 que no contienen ninguna de las cisteínas que se encuentran en la secuencia del polipéptido FGF21 de tipo salvaje, sino que en su lugar comprenden un sitio de unión al polímero introducido y, opcionalmente, una o más mutaciones adicionales, el polipéptido se pueden modificar
15 químicamente mediante la unión de un polímero, como se describe en el Ejemplo 9.

6. "Moléculas Ancladas"

En aún otro aspecto de la presente invención, una "molécula anclada" se puede preparar como se describe en este documento. Una "molécula anclada" es una molécula
20 que comprende dos polipéptidos FGF21 unidos entre sí mediante una molécula enlazadora. Mediante la unión de dos polipéptidos FGF21 juntos, la vida media efectiva y la potencia de una molécula anclada se puede extender más allá de la vida media y la potencia de un único polipéptido FGF21.

Una molécula anclada de la presente invención comprende un enlazador y dos
25 polipéptidos FGF21, los cuales pueden ser dos polipéptidos FGF21 naturales en los cuales no se han introducido mutaciones, dos polipéptidos mutantes FGF21 que tienen un sitio de unión del enlazador introducido en los polipéptidos FGF21 o una combinación de un polipéptido FGF21 de origen natural y un polipéptido mutante FGF21. Las moléculas ancladas que comprenden al menos un polipéptido FGF21 que tiene un sitio de unión del
30 enlazador de origen no natural y una o más mutaciones adicionales, también se contemplan y forman otro aspecto de la invención. Estas moléculas ancladas, por lo tanto, pueden comprender una mutación que forma un sitio para la unión de una molécula enlazadora, así como otra mutación para impartir otra propiedad deseable a la molécula anclada.

35 Como se usa en este documento, el término "sitio de unión del enlazador", significa un aminoácido de origen no natural que tiene un grupo funcional con el cual un

34

enlazador se puede asociar. En un ejemplo, un sitio de unión del enlazador es un residuo que contiene un grupo tiol, que puede asociarse con una molécula de PEG.

6.A. Polipéptidos FGF21 en una molécula anclada

5 Cuando una molécula anclada comprende dos polipéptidos mutantes FGF21, los polipéptidos mutantes FGF21 pueden comprender una o más mutaciones introducidas en la secuencia, pero las mutaciones no tienen que estar en la misma posición del aminoácido en cada uno de los polipéptidos mutantes FGF21. A modo de ejemplo, si una molécula anclada comprende dos polipéptidos mutantes FGF21, un polipéptido mutante FGF21
10 puede contener una mutación H125C, la cual puede formar un punto de unión para una molécula enlazadora. En contraste, el otro polipéptido mutante FGF21 puede contener una mutación en una posición diferente de H125, que puede servir como punto de unión para el enlazador que ancla los dos polipéptidos mutantes FGF21 juntos. Aún cuando se utilicen uno o dos polipéptidos mutantes FGF21, el enlazador puede unirse al extremo N-
15 terminal del polipéptido mutante de FGF2; los puntos de unión introducidos no tienen por qué necesariamente ser utilizados.

Cuando una molécula anclada comprende uno o dos polipéptidos FGF21 de origen natural, el enlazador puede unirse en un punto en el polipéptido FGF21 que es sensible a la química de unión. Por ejemplo, los puentes disulfuro de origen natural se pueden
20 reducir y los residuos de cisteína pueden servir como puntos de unión para un enlazador, tal como el PEG. En otra modalidad, un enlazador se puede unir a un polipéptido FGF21 en el N-terminal o en cadenas laterales de lisina.

Una o ambas polipéptidos mutantes FGF21 de una molécula anclada puede comprender un polipéptido mutante FGF21 truncado. Como se describe en este
25 documento, un polipéptido mutante FGF21 truncado se puede preparar mediante la eliminación de cualquier cantidad de residuos, ya sea en el N-terminal, el C-terminal o en ambos N- y C-terminales.

Las molécula ancladas también pueden comprender uno o ambos polipéptidos FGF21 los cuales comprenden una mutación en la secuencia del polipéptido que puede no
30 ser preferida como sitio de unión del enlazador, sino que puede impartir algunas otras propiedades deseables a la molécula anclada. De esta manera, las molécula ancladas que comprenden uno o más polipéptidos mutantes FGF21 en los cuales una mutación que imparte una propiedad deseable de la molécula anclada, forman un aspecto de la invención.

35 La actividad de las moléculas ancladas se puede analizar mediante una variedad de vías, por ejemplo, usando un ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa como se describe en este documento en el Ejemplo 10.

35

La actividad de las moléculas ancladas de la presente invención también puede evaluarse en un ensayo *in vivo*, tal como con ratones ob/ob, como se muestra en el Ejemplo 12. Generalmente, para evaluar la actividad *in vivo* de una o más de estos polipéptidos, el polipéptido se puede administrar a un animal de prueba por vía intraperitoneal. Después de uno o más períodos de tiempo deseados, se puede extraer una muestra de sangre y se pueden medir los niveles de glucosa en sangre.

Al igual que con todos los mutantes FGF21 de la invención, los polipéptidos FGF21 que comprende una molécula anclada, los cuales pueden ser polipéptidos mutantes FGF21, polipéptidos FGF21 de tipo salvaje o una combinación de ambos, pueden opcionalmente comprender un residuo de metionina amino-terminal, el cual puede introducirse mediante mutación dirigida o como resultado de un proceso de expresión bacteriana.

Aquellos con habilidades ordinarias en la materia, familiarizados con las técnicas de biología molecular estándares, pueden emplear ese conocimiento, conjuntamente con la presente descripción, para preparar y usar las moléculas ancladas de la presente invención. Se pueden usar técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejidos, y transformación (*por ejemplo*, electroporación, lipofección). *Ver, por ejemplo*, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, el cual se incorpora en la presente como referencia para cualquier propósito. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes, como se logra habitualmente en la materia, o como se describe en la presente. Los procesos para la asociación de los enlazadores con los polipéptidos FGF21 dependerán de la naturaleza del enlazador, pero son conocidos por los expertos en la materia. Ejemplos de químicas de unión de enlazadores se describen en este documento. La orientación sobre cómo se puede formar una molécula anclada de la presente invención se proporciona en el presente documento, por ejemplo en el Ejemplo 9.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas usadas en relación a, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química farmacéutica y médica descritos en este documento, son aquellos bien conocidos y de uso común en la técnica. Se pueden usar técnicas estándares para la síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y el tratamiento de los pacientes.

6.B. Enlazadores en moléculas ancladas

Cualquier enlazador puede ser empleado en una molécula anclada para anclar los dos polipéptidos mutantes FGF21 juntos. Las moléculas enlazadoras pueden ser

36

ramificadas o no ramificadas y pueden unirse a un polipéptido mutante FGF21 usando varias químicas conocidas, como las descritas en este documento. La estructura química de un enlazador no es crítica, ya que éste sirve principalmente como un espaciador. El enlazador puede ser independiente el mismo o diferente de cualquier otro enlazador, o enlazadores, que puedan estar presentes en una molécula anclada (*por ejemplo*, una molécula anclada que comprende tres o más polipéptidos FGF21 de tipo salvaje o mutantes). En una modalidad, un enlazador puede estar formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Algunos de estos aminoácidos pueden ser glicosilados, como es bien entendido por los expertos en la materia. Por ejemplo, una secuencia enlazadora útil que constituye un sitio sialilación es $X_1X_2NX_4X_5G$ (sec. con núm. de ident.: 5), en la cual X_1 , X_2 , X_4 y X_5 son cada uno independientemente cualquier residuo de aminoácido. En otra modalidad, una molécula enlazadora puede ser una molécula de PEG de cualquier tamaño, tal como de 20 kDa, 30 kDa y 40 kDa.

En modalidades en las cuales un enlazador peptidil está presente (*es decir*, formado por aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos) que se hace en longitud, preferiblemente, desde 1 hasta aproximadamente 40 residuos de aminoácidos, preferiblemente desde 1 hasta aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, y más preferiblemente desde 1 hasta aproximadamente 10 residuos de aminoácidos. En una modalidad, los residuos de aminoácidos en el enlazador se seleccionan a partir de cualquiera de los veinte aminoácidos canónicos. En otra modalidad, los residuos de aminoácidos en el enlazador se seleccionan a partir de cisteína, glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina, y/o serina. En aún otra modalidad, un enlazador peptidil está formado por una mayoría de aminoácidos que son estéricamente libres, tales como glicina, serina y alanina, unidos mediante un enlace peptídico. Es frecuentemente deseable que, si está presente, un enlazador peptidil sea seleccionado de manera que se evite el metabolismo proteolítico rápido en la circulación *in vivo*. De esta manera, los enlazadores peptidil preferidos incluyen poliglicinas, en particular $(Gly)_4$ (sec. con núm. de ident.: 6); $(Gly)_5$ (sec. con núm. de ident.: 7), poli (Gly-Ala), y polialaninas. Otros enlazadores peptidil preferidos incluyen GGGGS (sec. con núm. de ident.: 8); GGGGSGGGGS (sec. con núm. de ident.: 9); GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (sec. con núm. de ident.: 10) y cualquiera de los enlazadores utilizados en los ejemplos proporcionados en este documento. Los enlazadores descritos en este documento, sin embargo, son ejemplares; enlazadores dentro del alcance de esta invención pueden ser mucho más largos y pueden incluir otros residuos.

En las modalidades de una molécula anclada que comprende un resto del enlazador de péptidos, residuos ácidos, por ejemplo, residuos glutamato o aspartato, se colocan en la secuencia de aminoácidos del resto del enlazador. Los ejemplos incluyen las

32

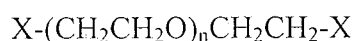
siguientes secuencias de péptido enlazadoras:

- GGEGGG (sec. con núm. de ident.: 11);
- GGEEEGGG (sec. con núm. de ident.: 12);
- GEEEG (sec. con núm. de ident.: 13);
- 5 GEEE (sec. con núm. de ident.: 14);
- GGDGGG (sec. con núm. de ident.: 15);
- GGDDDG (sec. con núm. de ident.: 16);
- GDDDG (sec. con núm. de ident.: 17);
- GDDD (sec. con núm. de ident.: 18);
- 10 GGGGSDDSDEGSDGEDGGGGS (sec. con núm. de ident.: 19);
- WEWEW (sec. con núm. de ident.: 20);
- FEFEF (sec. con núm. de ident.: 21);
- EEEWWW (sec. con núm. de ident.: 22);
- EEEEFF (sec. con núm. de ident.: 23);
- 15 WEEEEWW (sec. con núm. de ident.: 24); or
- FFEEFF (sec. con núm. de ident.: 25).

En otras realizaciones, un enlazador peptídico constituye un sitio de fosforilación, por ejemplo. $X_1X_2YX_3X_4G$ (sec. con núm. de ident.: 26), en donde X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son cada uno independientemente cualquier residuo de aminoácidos; $X_1X_2SX_3X_4G$ (sec. con núm. de ident.: 27), en donde X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son cada uno independientemente cualquier residuo de aminoácidos; o $X_1X_2TX_3X_4G$ (sec. con núm. de ident.: 28), en donde X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son cada uno independientemente cualquier residuo de aminoácidos.

Los enlazadores no peptídicos se pueden usar también en una molécula anclada. Por ejemplo, se pudieran usar enlazadores alquilo tal como $-NH-(CH_2)_s-C(O)-$, en donde $s = 2$ a 20. Estos enlazadores alquilo se pueden sustituir, además, por cualquier grupo estéricamente no impedido tal como alquil inferior (*por ejemplo*, C_1-C_6) acil inferior, halógeno (*por ejemplo*, Cl, Br), CN, NH_2 , fenil, etc.

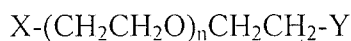
Cualquier enlazador adecuado se puede emplear en la presente invención para formar moléculas ancladas. En un ejemplo, el enlazador usado para producir molécula ancladas descrito en la presente fueron las moléculas PEG bis-maleimida homobifuncionales que tienen la estructura general:



donde X es un grupo maleimida. En otras realizaciones, X puede ser un ortopiridil-disulfuro, una iodoacetamida, una vinilsulfona o cualquier otra porción reactiva conocida en la materia por ser específica para los grupos tiol. En aún otra modalidad X puede ser una porción reactiva amino-específica usada para anclar dos polipéptidos mutantes a través del N-terminal o un grupo lisil modificado. (*Ver. por ejemplo*, Pasut and Veronese,

2006, "PEGylation of Proteins Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates," *Adv. Polym. Sci.* 192:95-134).

En aún otra modalidad, un enlazador puede tener la estructura general:



5 donde X y Y son porciones reactivas diferentes seleccionadas de los grupos anteriores. Un enlazador de este tipo pudiera permitir la conjugación de diferentes polipéptidos mutantes para generar los heterodímeros anclados o hetero-oligómeros.

En una modalidad adicional, un enlazador puede ser una molécula PEG, que puede tener un peso molecular de 1 a 100 kDa, preferentemente 10 a 50 kDa (por
10 ejemplo, 10, 20, 30 ó 40 kDa) y más preferentemente 20 kDa. Los enlazadores péptidos se pueden alterar para formar derivados de la misma manera que se describió anteriormente.

Otros ejemplos de enlazadores útiles incluyen los enlazadores de aminoetiloxietiloxi-acetil como se describió en la publicación internacional núm. WO
15 2006/042151, incorporada en la presente como referencia en su totalidad.

Al formarse una molécula anclada de la presente invención, se pueden emplear químicas estándares para asociar un enlazador con una molécula de FGF21 mutante o de tipo salvaje. El método preciso de asociación dependerá del sitio de unión (*por ejemplo*,
cuáles cadenas laterales de aminoácidos) y la naturaleza del enlazador. Cuando un
20 enlazador es una molécula de PEG, la unión se puede lograr mediante el empleo de la química estándar y un grupo amino o sulfhidrilo libre, tal como los que se encuentran en los residuos cisteína (los cuales pueden introducirse en la secuencia polipeptídica de FGF21 por mutación o pueden ser de origen natural) o lisina (los cuales se puede introducir en la secuencia polipeptídica de FGF21 mediante mutación o pueden ser de
25 origen natural) o grupos amino N-terminal.

7. Modificación química de los mutantes FGF21

En un aspecto de la presente invención, los polipéptidos mutantes FGF21 se han modificado químicamente. El término "modificado químicamente" se refiere a un
30 polipéptido (por ejemplo, un polipéptido mutante FGF21) que se ha modificado mediante la adición de un polímero en uno o más sitios del polipéptido. Los ejemplos de formas modificadas químicamente de un polipéptido mutante FGF21 incluyen las formas pegiladas y glicosiladas de un polipéptido mutante FGF21.

Los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente de la presente
35 invención pueden comprender cualquier tipo de polímero, incluyendo los polímeros solubles en agua, tales como el PEG. Los polímeros ejemplares pueden ser de cualquier peso molecular y pueden ser ramificados o no ramificados. Los polímeros tienen

típicamente un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2 kDa hasta aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que en las preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más y otras menos que el peso molecular indicado). El peso molecular promedio de cada polímero es
 5 preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 40 kDa, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 20 kDa.

Los polímeros solubles en agua apropiados o las mezclas de los mismos incluyen, pero no se limitan a, los carbohidratos, el polietilenglicol (PEG) (incluyendo las formas de
 10 PEG que se usan para derivatizar proteínas, que incluyen mono-(C₁-C₁₀), alcoxi-, o ariloxi-polietilenglicol), monometoxi-polietilenglicol, dextrano (tal como dextrano de bajo peso molecular, por ejemplo, de aproximadamente 6 kD), celulosa, u otros polímeros a base de carbohidratos, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, co-polímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles
 15 polioxietilados (*por ejemplo*, glicerol), y alcohol de polivinilo. La presente invención también comprende moléculas reticulantes bifuncionales que se pueden usar para preparar la unión covalentemente multímeros de polipéptidos mutantes FGF21. También se comprenden dentro de la presente invención los mutantes FGF21 covalentemente unidos al ácido polisiálico.

20 En algunas modalidades de la presente invención, un polipéptido mutante FGF21 es covalentemente modificado para incluir uno o más polímeros solubles en agua, incluyendo pero no limitados a, el polietilenglicol (PEG), polioxietilenglicol, o polipropilenglicol. Ver, *por ejemplo*, las patentes de los Estados Unidos núms. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 y 4,179,337. En algunas modalidades de la
 25 invención, un mutante de FGF21 comprende uno o más polímeros, incluyendo pero no limitado al monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, otro polímero a base de carbohidratos, poli-(N-vinil pirrolidona) de polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un co-polímero de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (*por ejemplo*, glicerol), polivinil alcohol, o mezclas de dichos polímeros.

30 En aún otras realizaciones de la presente invención, un péptido o una proteína se pueden conjugar a FGF21 en una forma sitio dirigida, aunque los residuos antes mencionados se obtienen mediante ingeniería genética con el objetivo de impartir propiedades favorables a FGF21 (por ejemplo, potencia, estabilidad, selectividad). De esta manera, la presente invención comprende polipéptidos mutantes FGF21 conjugados a
 35 una heteroproteína o heteropéptido en un sitio de unión al polímero introducido. Ejemplos de proteínas adecuadas incluyen HSA y los anticuerpos que no se unen a FGF21.

7.A. Polipéptidos mutantes FGF21 pegilados

En algunas modalidades de la presente invención, un polipéptido mutante FGF21 es covalentemente modificado con subunidades de PEG. En algunas modalidades, uno o
 5 varios polímeros solubles en agua se unen en una o más posiciones específicas (por ejemplo, en el extremo N-terminal) del mutante de FGF21. En algunas modalidades, uno o más polímeros solubles en agua se unen a una o más cadenas laterales de un mutante de FGF21, estas cadenas laterales pueden ser de origen natural o pueden formar un
 componente de un sitio de unión al polímero obtenido mediante ingeniería genética. En
 10 algunas modalidades, el PEG se usa para mejorar la capacidad terapéutica de un polipéptido mutante FGF21. Algunos métodos se discuten, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos núm. 6,133,426, que se incorpora en este documento como referencia para cualquier propósito.

En las modalidades de la presente invención, en las cuales el polímero es PEG, el
 15 grupo PEG puede ser de cualquier peso molecular conveniente, y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular promedio del grupo PEG, se encontrará preferiblemente en el rango de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, y más preferiblemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, *por ejemplo*, 10, 20, 30, 40 ó 50 kDa. Los grupos PEG generalmente se unirán al mutante de FGF21 vía alquilación
 20 reductiva o acilación a través de un grupo reactivo en el resto de PEG (*por ejemplo*, un aldehído, NHS, o maleimida, vinilsulfona, alquilhaluro) a un grupo reactivo en el mutante FGF21 (*por ejemplo*, un grupo tiol o amino).

Cuando el(los) polímero(s) unido(s) a un polipéptido mutante FGF21 es(son) PEG, la PEGilación de un polipéptido mutante FGF21 de la presente invención, se puede
 25 llevar a cabo específicamente usando cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidos en la técnica. Estas reacciones se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Zalipsky, 1995, *Funcionalized Poly(ethylene glycol) for preparation of Biologically Relevant Conjugates*. Bioconjugate Chemistry 6:150-165; Francis y otros, 1992, *Focus on Growth Factors* 3: 4-10; patentes europeas núms. 0 154 0 401 316 y 384,
 30 y patente de los Estados de Unidos núm. 4,179,337. Por ejemplo, cuando el residuo objetivo es un residuo lisina (*es decir*, un residuo con un grupo amino reactivo) la PEGilación puede llevarse a cabo vía una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol amino-reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo) como se describe en este documento. Para las reacciones de
 35 acilación, un polímero seleccionado puede tener un solo grupo éster reactivo. Para la alquilación reductiva, un polímero seleccionado puede tener un solo grupo aldehído reactivo. Un aldehído reactivo es, *por ejemplo*, el propionaldehído polietilenglicol, el cual

41

es estable en agua, o mono alcoxi C_1-C_{10} o derivados de ariloxi de los mismos (ver la patente de los Estados Unidos núm. 5,252,714). Varios polímeros PEG reactivos activados con diferentes porciones amino-específicos también se conocen por aquellos expertos en la materia y también se puede utilizar según las circunstancias lo exijan.

5 En otro ejemplo, cuando el residuo objetivo es un residuo cisteína (es decir, un residuo con un grupo sulfhidrilo reactivo) la PEGilación puede llevarse a cabo a través de la química de maleimida estándar. Para esta reacción, el polímero seleccionado puede contener uno o más grupos reactivos maleimida u otros restos reactivos tioles tales como vinilsulfona, ortopiridil-disulfuro o yodoacetamida. Ver. *por ejemplo*, Pasut & Veronese,
 10 2006, "PEGylation of Proteins as Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates," *Adv. Polym. Sci.* 192:95-134; Zalipsky, 1995. "Functionalized Poly(ethylene glycol) for Preparation of Biologically Relevant Conjugates", *Bioconjugate Chemistry* 6:150-165, y Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2^{da} Ed., Academic Press, 2008, cada una de las cuales se incorpora en este documento como referencia.

15 En algunas modalidades de la presente invención, una estrategia útil para la unión del grupo PEG a un mutante de FGF21 involucra la combinación a través de la formación de una unión conjugada en solución, un mutante de FGF21 y un resto de PEG, cada uno portando una funcionalidad especial que es mutuamente reactiva hacia la otra. El mutante de FGF21 es "pre-activado" con un grupo funcional apropiado en un lugar específico. Los
 20 precursores son purificados y completamente caracterizados antes de reaccionar con el resto de PEG. La ligazón del mutante de FGF21 con PEG usualmente tiene lugar en fase acuosa, y puede ser fácilmente controlada mediante SDS-PAGE o HPLC analítica de fase reversa. El análisis detallado se puede hacer mediante el mapeo de péptidos basado en LC-MS. El análisis detallado se puede hacer mediante el mapeo de péptidos basado en
 25 LC-MS.

7.B. Polisacáridos de los polipéptidos mutantes FGF21

Los polímeros de polisacáridos son otro tipo de polímeros solubles en agua que pueden usar para la modificación de proteínas. Por lo tanto, los polipéptidos mutantes
 30 FGF21 de la presente invención se pueden unir a un polímero de polisacárido para formar las realizaciones de la invención. De esta manera, un sitio de unión al polímero de origen no natural obtenido por ingeniería genética en un polipéptido mutante FGF21 puede comprender un residuo al cual se une un polisacárido. Los dextranos son polímeros de polisacáridos compuestos por subunidades individuales de glucosa en su mayor parte
 35 unidas mediante enlaces alfa 1-6. El propio dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular, y es fácilmente disponible en pesos moleculares desde aproximadamente 1 kD hasta aproximadamente 70 kD. El dextrano es un polímero soluble

en agua adecuado para su uso como un vehículo por sí solo o en combinación con otro vehículo (*por ejemplo*, Fc). *Ver, por ejemplo*, la publicación internacional núm. WO 96/11953. Se ha reportado el uso del dextrano conjugado a inmunoglobulinas terapéuticas o de diagnóstico. *Ver, por ejemplo*, la publicación de la patente europea núm. 0 315 456, que se incorpora en este documento por referencia. La presente invención también comprende el uso del dextrano de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 20 kDa.

7.C. Métodos de modificar químicamente un polipéptido mutante FGF21

En general, la modificación química (*por ejemplo*, PEGilación o glicosilación), se puede realizar bajo cualquier condición adecuada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activado. Los métodos para la preparación de los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente generalmente comprenderá las etapas de: (a) hacer reaccionar el polipéptido con la molécula de polímero activado (tal como un éster maleimida, o aldehído reactivos, derivados de la molécula de polímero) bajo condiciones en las que un polipéptido mutante FGF21 se une a una o más moléculas del polímero, y (b) obtención de los productos de reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán en función de los parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, mientras mayor sea la proporción de las moléculas del polímero con respecto a la proteína, mayor será el porcentaje de la molécula del polímero que se une. En una modalidad de la presente invención, los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente pueden tener una sola molécula de polímero en el amino-terminal, mientras que en otras realizaciones un polipéptido mutante FGF21 puede tener dos o más polímeros asociados a la secuencia principal, por ejemplo, un polímero en el N-terminal del polipéptido y un segundo polímero en otro de los residuos del polipéptido. Alternativamente, un mutante de FGF21 puede tener dos o más polímeros asociados en dos residuos diferentes en la secuencia principal, pero no en el N-terminal.

Generalmente, las condiciones que pueden ser aliviadas o moduladas mediante la administración de los presentes polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente incluyen las descritas en este documento para el polipéptido de FGF21 nativo. Sin embargo, los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente divulgados en este documento pueden tener actividades adicionales, tales como la vida media incrementada, en comparación con los FGF21 de tipo salvaje y los mutantes de FGF21.

8. Composiciones terapéuticas de los mutantes FGF21 y administración de los mismos

Las composiciones terapéuticas que comprenden los polipéptidos mutantes FGF21 están dentro del alcance de la presente invención, y se contemplan específicamente a la

luz de la identificación de las moléculas ancladas, los polipéptidos mutantes FGF21 y los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente que presentan propiedades mejoradas. Tales composiciones terapéuticas de moléculas ancladas, polipéptidos mutantes de FGF21 y polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente, pueden comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de una moléculas anclada, polipéptidos mutantes FGF21 y polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente, los cuales pueden ser modificados químicamente, en una mezcla con un agente de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptable, seleccionado por su idoneidad con el modo de administración.

Los materiales de formulación aceptables preferiblemente son no tóxicos para los receptores en las dosis y las concentraciones empleadas.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la absorción, o la penetración de la composición. Los materiales de formulación apropiados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno sulfito de sodio), tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos), agentes de volumen (tal como manitol o glicina), agentes quelantes (tal como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)), agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina, o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), rellenos, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa, o dextrina), proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas), colorantes, aromatizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrofílicos (tal como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones que forman la sales (tal como el sodio), conservantes (tal como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetilo, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico, o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol), alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, surfactantes o agentes humectantes (tal como plurónicos; PEG; ésteres de sorbitán; polisorbato tal como polisorbato 20 o polisorbato 80; tritón; trometamina, lecitina, colesterol o tiloxapal), agentes que incrementan la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes que incrementan la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos -preferiblemente cloruro de sodio o de potasio- o sorbitol, manitol), vehículos de administración, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos (ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18ª ed., A.R. Gennaro, ed., Mack

44

Publishing Company, 1990), y las ediciones posteriores de la misma, incorporadas en este documento por referencia para cualquier propósito).

La composición farmacéutica óptima será determinada por un experto en la materia en función de, por ejemplo, la ruta de administración prevista, formato de administración, y la dosis deseada (*ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science*). Tales composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de la molécula anclada, los polipéptido mutantes FGF21 (los cuales pueden ser truncados, encapuchados o mutados en el C-terminal) o los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente.

El principal vehículo o portador en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador apropiado para la inyección puede ser agua, solución salina fisiológica, o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente suplementado con otros materiales comunes en las composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o salina mezclada con albúmina de suero son vehículos adicionales ejemplares. Otras composiciones farmacéuticas ejemplares comprenden tampón Tris de pH aproximadamente 7,0-8,5, o tampón acetato de pH aproximadamente 4,0 a 5,5, las cuales pueden incluir adicionalmente sorbitol o un sustituto apropiado. En una modalidad de la presente invención, las composiciones de las moléculas ancladas, los polipéptidos mutantes FGF21 y los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente, se pueden preparar para el almacenamiento mediante la mezcla de la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con los agentes de formulación opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, el producto de la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 y el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente, se pueden formular como un liofilizado, utilizando excipientes apropiados tales como la sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden seleccionarse para la administración parenteral. Por otra parte, las composiciones pueden seleccionarse para la inhalación o la administración a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la habilidad en la técnica.

Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que sean aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, los tampones se usan para mantener la composición al pH fisiológico o en un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un intervalo de pH de 5 a 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para el uso en esta invención pueden ser en forma de una solución acuosa libre de

NS

pirógenos, aceptable parenteralmente, que comprende la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 y el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente deseados en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente apropiado para inyección parenteral es agua destilada estéril, en cual se formula una molécula anclada, un polipéptido mutante FGF21 o un polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente como una solución estéril, isotónica, y apropiadamente conservada. Sin embargo, otra preparación puede involucrar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), granos, o liposomas, que proporcionan la liberación controlada o sostenida del producto, el cual puede administrarse a través de una inyección de depósito. El ácido hialurónico también se puede utilizar, y este puede tener el efecto de promover duración sostenida en la circulación. Otros medios apropiados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos implantables de administración de fármacos.

En una modalidad, se puede formular una composición farmacéutica para la inhalación. Por ejemplo, la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 y el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente se pueden formular como un polvo seco para la inhalación. Tales soluciones de inhalación también se pueden formular con un propulsor para la administración en aerosol. En otra modalidad, las soluciones se pueden nebulizar. La administración pulmonar se describe en más detalle en la publicación internacional núm. WO 94/20069, la cual describe la administración pulmonar de las proteínas modificadas químicamente.

También se contempla que ciertas formulaciones se puedan administrar por vía oral. En una modalidad de la invención, una molécula anclada, un polipéptido mutante FGF21 (que puede ser truncado, encapuchado o mutado en el C-terminal) o un polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente que se administran de esta manera, se pueden formular con o sin estos portadores habitualmente usados en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, se puede diseñar una caperuza para liberar la porción activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se reduce al mínimo la degradación pre-sistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 (que puede ser truncado, encapuchado o mutado en el C-terminal) o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente. También se pueden emplear diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de desintegración de comprimido, y aglutinantes.

56

Otra composición farmacéutica puede involucrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula anclada, un polipéptido mutante FGF21 (que puede ser truncado, encapuchado o mutado en el C-terminal) o un polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente en una mezcla con excipientes no tóxicos que son apropiados para la fabricación de los comprimidos. Mediante la disolución de los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, se pueden preparar soluciones en forma de dosis unitarias. Los excipientes apropiados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábica, o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las composiciones farmacéuticas de la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente serán evidentes para los expertos en la materia, incluyendo las formulaciones que involucran la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente en fórmulas de liberación controlada o sostenida. Las técnicas para la formulación de una variedad de otros medios de liberación controlada o sostenida, tales como portadores de liposomas, micropartículas bio-erosionables o granos porosos y las inyecciones de depósito, también son conocidos por los expertos en la materia (*ver, por ejemplo*, la publicación internacional núm. WO 93/15722, la cual describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de las composiciones farmacéuticas).

Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos configurados, *por ejemplo*, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (patente los Estados Unidos núm. 3,773,919 y patente europea núm. 0 058 481), copolímeros del ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman y otros, 1983, *Biopolymers* 22.: 547-56), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer y otros, 1981, *J. Biomed. Mater. Res* 15: 167-277 y Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105), acetato de vinilo de etileno (Langer y otros, *supra*) o poli-D (-)-ácido 3-hidroxibutírico (Patente Europea núm. 0 133 988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, los cuales se pueden preparar por cualquiera de los varios métodos conocidos en la técnica. *ver, por ejemplo*, Epstein y otros, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3688-92; y patentes europeas núms. 0 036 676, 0 088 046, y 0 143 949.

Una composición farmacéutica de la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente que se utilizará para la administración *in vivo* típicamente tiene que ser estéril. Esto se puede lograr mediante la

52

filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición es liofilizada, la esterilización usando este método se puede realizar ya sea antes o después de la liofilización y la reconstitución. La composición para la administración parenteral se puede almacenar en forma liofilizada o en una solución. Además, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja hipodérmica.

Una vez que la composición farmacéutica se ha formulado, esta se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólidos, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden almacenar en una forma lista para su uso o en una forma (*por ejemplo*, liofilizadas) que requieren la reconstitución antes de su administración.

En una modalidad particular, la presente invención se refiere a los kits para la producción de una unidad de administración de dosis única. Los kits pueden contener, cada uno, un primer envase con una proteína seca y un segundo envase que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de la presente invención los kits que contienen jeringas precargadas de una o varias cámaras (*por ejemplo*, jeringas de líquido y liojeringas).

Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 (que puede ser truncado, encapuchado o mutado en el C-terminal) o del polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente que se empleará terapéuticamente, dependerá por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento puede variar dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la cual es usada la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente, la vía de administración, y el tamaño (peso, superficie corporal, o tamaño de los órganos) y la condición (la edad y estado general de salud) del paciente. En consecuencia, el clínico puede valorar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica se puede encontrar en el intervalo desde aproximadamente 0.1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación se puede encontrar en el intervalo de 0.01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg o 10 mg/kg.

28

La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente en la formulación que se usa. Típicamente, un clínico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado.

- 5 La composición, por lo tanto, se puede administrar como una dosis única, como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) en el tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implante o de un catéter. El perfeccionamiento de la dosificación apropiada se realiza de forma rutinaria por los expertos en la materia y está dentro del ámbito de las tareas de rutina realizadas por ellos.
- 10 Las dosificaciones adecuadas se pueden determinar a través del uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

- La ruta de administración de la composición farmacéutica está en concordancia con los métodos conocidos, *por ejemplo*, por vía oral; a través de inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular,
- 15 intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida; o por implantación. Donde se desee, las composiciones se pueden administrar por inyección de bolus o continuamente por infusión, o por dispositivo de implantación.

- Alternativamente o adicionalmente, la composición se puede administrar
- 20 localmente a través de la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el cual se absorbe o se encapsula la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implante, el dispositivo se puede implantar en cualquier tejido u órgano apropiado, y la administración de la molécula deseada puede ser a través de la difusión, la liberación en el tiempo del bolo, o de la administración continua.

25

10. Usos terapéuticos de los polipéptido mutantes FGF21

- Las moléculas ancladas, los polipéptidos mutantes FGF21 (que pueden ser truncados, encapuchados o mutados en el C-terminal) y los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente de la invención, se puede utilizar para tratar, diagnosticar,
- 30 aliviar o prevenir un número de enfermedades, trastornos o afecciones, incluyendo, pero no limitados a los trastornos metabólicos. En una modalidad, el trastorno metabólico que se tratará es la diabetes. En otra modalidad, el trastorno metabólico es la obesidad. Otras realizaciones incluyen afecciones metabólicas o trastornos tales como dislipidemia, hipertensión, hepatosteatoosis, tales como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA),
- 35 enfermedad cardiovascular, tal como aterosclerosis y envejecimiento.

En la solicitud, un trastorno o afección tal como la diabetes o la obesidad se pueden tratar mediante la administración de una molécula anclada, polipéptido mutante

49

FGF21 o polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente, según lo descrito en este documento a un paciente que lo necesite, en la cantidad de una dosis terapéuticamente efectiva. La administración puede realizarse como se describe en este documento, tal como mediante inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular o por vía oral en forma de una tableta o de formación de líquido. En la mayoría de las situaciones, una dosificación deseada se puede determinar por un médico, como se describe en este documento, y puede representar una dosis terapéuticamente efectiva de la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente. Será evidente para los expertos en la materia que una dosis terapéuticamente efectiva de la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente dependerá, *entre otras cosas*, del esquema de administración, la dosis unitaria del antígeno administrado, si la molécula de ácido nucleico o polipéptido se administra en combinación con otros agentes terapéuticos, el estado inmunológico y la salud del receptor. El término "dosis terapéuticamente efectiva", como se usa en este documento, significa la cantidad de la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente que provoca la respuesta biológica o médica en un sistema de tejidos, animal o humano que se busca por un investigador, doctor en medicina, u otro clínico, la cual incluye el alivio de los síntomas de una enfermedad o trastorno que se trata.

11. Anticuerpos

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a las moléculas ancladas, polipéptidos mutantes FGF21 y polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente de la invención, pero que no se unen específicamente a los polipéptidos FGF21 de tipo salvaje se contemplan y están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser policlonales, incluyendo policlonales monoespecíficos; monoclonales (AcM); recombinantes; quiméricos, humanizados, tales como de regiones determinantes de complementariedad (CDR) trasplantadas; humanos; de simple cadena, y/o biespecíficos, así como fragmentos; variantes; o moléculas modificadas químicamente de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen aquellas porciones de los anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo de un polipéptido mutante FGF21. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen los fragmentos Fab y F (ab') generados por la escisión enzimática de los anticuerpos de longitud completa. Otros fragmentos que se unen son los generados por técnicas de ADN recombinante, tales como la expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican las regiones variables del anticuerpo.

Los anticuerpos policlonales dirigidos hacia una molécula anclada, polipéptido

50

mutante FGF21 o polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente, generalmente se producen en animales (*por ejemplo*, conejos o ratones) por medio de múltiples inyecciones por vía subcutánea o intraperitoneal del polipéptido mutante FGF21 y un adyuvante. Puede ser útil conjugar un polipéptido mutante FGF21 a una proteína portadora que es inmunogénica en las especies a inmunizar, tal como la hemocianina de lapa, la albúmina sérica, la tiroglobulina de la especie bovina, o el inhibidor de la tripsina de soja. Además, agentes de agregación tales como la alúmina, se utilizan para mejorar la respuesta inmune. Después de la inmunización, los animales se desangran y el suero se analiza para los títulos de anticuerpos anti-molécula anclada, anti-polipéptido mutante FGF21 o anti-polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la molécula anclada, el polipéptido mutante FGF21 o el polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente, se pueden producir usando cualquier método que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Los ejemplos de métodos apropiados para la preparación de anticuerpos monoclonales incluyen los métodos del hibridoma de Kohler *y otros*, 1975, *Nature* 256: 495-97 y el método del hibridoma de células B humanas (Kozbor, 1984, *J. Immunol* 133: 3001; Brodeur *y otros*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). La invención proporciona también líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con las moléculas ancladas, los polipéptidos mutantes FGF21 o los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente

Los anticuerpos anti-mutantes FGF21 de la invención se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tal como los ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos, y los ensayos de inmunoprecipitación (*ver, por ejemplo*, Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (CRC Press, Inc., 1987), incorporado en este documento por referencia en su totalidad) para la detección y cuantificación de los polipéptidos mutantes FGF21. Los anticuerpos se unirán a los polipéptidos mutantes FGF21 con una afinidad que es apropiada para el método de ensayo que se emplea.

Para las aplicaciones en diagnóstico, en ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-molécula anclada, anti-polipéptido mutante FGF21 o anti-polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente, se pueden marcar con un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In , o ^{67}Ga ; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o peroxidasa de rábano (Bayer *y otros*, 1990, *Meth. Enz* 184:

51

138-63).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un estándar marcado (*por ejemplo*, un polipéptido mutante FGF21, o una porción inmunológicamente reactiva del mismo) para competir con el analito de la muestra de ensayo (*por ejemplo*, una molécula anclada, un polipéptido mutante FGF21 o un polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente) para la unión con una cantidad limitada de un anticuerpo anti-molécula anclada, anti-polipéptido mutante FGF21 o anti-polipéptido mutante FGF21 modificados químicamente, dependiendo del analito. La cantidad de molécula anclada, polipéptido mutante FGF21 o polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad del estándar que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad del estándar que se une, los anticuerpos se solubilizan típicamente antes o después de la competencia, de manera que el estándar y el analito que se unen a los anticuerpos pueden convenientemente separarse del estándar y del analito que se mantienen sin unirse.

Los ensayos de tipo sándwich típicamente involucran el uso de dos anticuerpos, cada uno de los cuales es capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente o epítipo de la proteína a detectarse y/o cuantificarse. En un ensayo tipo sándwich, el analito de la muestra de prueba se une típicamente a un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido, y, posteriormente, un segundo anticuerpo se une al analito, formándose así un complejo insoluble en tres partes. Ver, *por ejemplo*, la patente los Estados Unidos núm. 4,376,110. El segundo anticuerpo se puede marcar con un resto detectable (ensayos tipo sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se marca con un resto detectable (ensayos tipo sándwich indirectos). Por ejemplo, uno de estos tipos de ensayos sándwich es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), en cuyo caso la fracción detectable es una enzima.

Los anticuerpos anti-molécula anclada, anti-polipéptido mutante FGF21 o anti-polipéptido mutante FGF21 modificado químicamente, son también útiles para la proyección de imagen *in vivo*. Un anticuerpo marcado con un resto detectable se puede administrar a un animal, preferiblemente en el torrente sanguíneo, y se analiza la presencia y localización del anticuerpo marcado en el huésped ensayado. El anticuerpo se puede marcar con cualquier resto que sea detectable en un animal, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología, u otros medios de detección conocidos en la materia.

La invención también se relaciona con un kit que comprende moléculas ancladas, polipéptidos mutantes FGF21 o polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente y otros reactivos útiles para la detección de las moléculas ancladas, los polipéptidos mutantes FGF21 o los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente en muestras biológicas. Tales reactivos pueden incluir una marca detectable, suero de

52

bloqueo, muestras de control positivas y negativas, y los reactivos de detección.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de las realizaciones concretas de la invención, y los diversos usos del mismo. Ellos se exponen únicamente con propósitos explicativos, y no deben interpretarse en modo alguno como limitación del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Preparación de las construcciones de expresión del polipéptido FGF21

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido maduro FGF21 se obtuvo mediante amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que tienen secuencias de nucleótidos correspondientes a los extremos 5' y 3' de la secuencia madura del FGF21. La Tabla 4 lista los cebadores que se usaron para amplificar la secuencia madura de FGF21.

TABLA 4

Cebadores de PCR para preparar el constructo de FGF21

Cebador	Secuencia	sec. con núm. de ident.:
Sentido	5'-AGGAGGAATAACATATGCATCCAATTCCAGATTCTTCTCC-3'	33
Antisentido	5'-TAGTGAGCTCGAATTCTTAGGAAGCGTAGCTGG-3'	34

Los cebadores usados para preparar el constructo de expresión de FGF21 incorporaron sitios de restricción de endonucleasas para la clonación direccional de la secuencia en un vector de expresión adecuado (por ejemplo, pET30 (Novagen/EMD Biosciences; San Diego, CA) o pAMG33 (Amgen; Thousand Oaks, CA)). El vector de expresión pAMG33 contiene un origen de replicación R-100 de bajo número de copias, un promotor *lac* modificado, y un gen de resistencia a la kanamicina. El vector de expresión pET30 contiene un origen de la replicación derivado de pBR322, un promotor inducible T7, y un gen de resistencia a la kanamicina. Mientras que la expresión de pAMG33 se encontró que era más alta, pET30 resultó ser un vector de clonación más fiable. Por lo tanto, la mayoría de las construcciones descritas en la presente solicitud se generaron por primera vez en pET30 y entonces se detectaron por eficacia. Las secuencias seleccionadas se transfirieron a pAMG33 para la amplificación adicional.

La secuencia de FGF21 se amplificó en una mezcla de reacción que contenía 40.65 µl dH₂O, 5µl de tampón de reacción (10x) PfuUltra II, 1.25 µl de la mezcla de

53

dNTP (40 mM – 4 x 10mM), 0.1 µl de la plantilla (100 ng/ml), 1 µl Cebador1 (10/M), 1 µl Cebador2 (10 µM), y µl de la ADN polimerasa de fusión SA PfuUltra II (Stratagene, La Jolla, CA). Las reacciones de amplificación se realizaron mediante el calentamiento dos minutos a 95° C, seguida de diez ciclos a 95° C durante 20 segundos, 60° C durante 20 segundos (con un 1° C adicional restado por ciclo), y 72° C durante 15 segundos/kilobase del producto deseado; seguido de 20 ciclos a 94° C durante 20 segundos, 55° C durante 20 segundos. y 72° C durante 15 segundos/kilobase del producto deseado; seguido de 72° C por tres minutos. Los productos de amplificación se digirieron con las endonucleasas de restricción NdeI y EcoRI, se ligó en un vector adecuado, y luego se transformó en células competentes.

Como resultado del sistema de expresión bacteriana empleado, el polipéptido maduro FGF21 expresado incluyó un residuo de metionina N-terminal o una variante del residuo de metionina tal como f-Met o Met gluconada.

15

EJEMPLO 2

Purificación de los polipéptidos FGF21 de tipo salvaje de bacterias

En los ejemplos que siguen, polipéptidos FGF21 de tipo salvaje se expresaron en un sistema de expresión bacteriana. Después de la expresión, la cual se describe a continuación, los polipéptidos FGF21 de tipo salvaje se purificaron como se describe en este ejemplo, a menos que se indique lo contrario.

Para purificar el polipéptido FGF21 de tipo salvaje a partir de los cuerpos de inclusión bacterianos, los cuerpos de inclusión doblemente lavados (DWIBs) se solubilizaron en un tampón de solubilización que contiene clorhidrato de guanidina y TDT en tampón Tris a pH 8.5 y luego se mezclaron durante una hora a temperatura ambiente, y la mezcla de solubilización se añadió a un tampón de re-plegamiento que contenía urea, arginina, cisteína, y el clorhidrato de cisteamina a pH 9.5 y luego se mezcló durante 24 horas a 5° C (ver, por ejemplo, Clarke, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 157-63; Mannall y otros, 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1523-34; Rudolph y otros, 1997, "Folding proteins," en *Protein Function: A Practical Approach* (Creighton, ed., Nueva York. IRL Press), pp 57-99; y Ishibashi y otros, 2005, *Protein Expr. Purif.* 42: 1-6).

Después de la solubilización y replegamiento, la mezcla se filtró a través de un filtro de 0.45 micras. El grupo replegado se concentró aproximadamente 10 veces con un casete Pall Omega con un corte de peso molecular de 10 kDa a una presión de transmembrana (PTM) de 20 psi, y se diafiltró con 3 volúmenes de columna de Tris 20 mM, pH 8.0 en una PTM de 20 psi.

La muestra aclarada se sometió a cromatografía de intercambio de aniones (AEX) mediante el uso de la resina Q Sepharose HP. Un gradiente salino lineal de NaCl de 0 a

5M

250 mM en Tris 20 mM se corrió a un pH de 8.0 a 5° C. Las fracciones del pico se analizaron por SDS-PAGE y se agruparon.

El grupo eluido de AEX se sometió a cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) con una resina de Fenil Sepharosa HP. La proteína se eluyó usando un gradiente lineal decreciente de 0.7 M a 0 M sulfato amónico a pH 8.0 y temperatura ambiente. Las fracciones del pico se analizaron por SDS-PAGE (Laemmli, 1970, *Nature* 227: 680-85) y se agruparon.

El grupo de HIC se concentró con un casete de 0.2 m² Pall Omega con un corte de peso molecular de 10 kD, a 7 mg/ml a una PTM de 20 psi. El concentrado se dialfiltró con 5 volúmenes de KPO₄ 10 mM, 5% de sorbitol, un pH de 8.0 a una PTM de 20 psi, y el concentrado recuperado se diluyó a 5 mg/ml. Por último, la solución se filtró a través de una membrana mini-Pall Kleenpac Posidyne de 0.2 µM.

Ejemplo 3

15 Identificación de mutantes FGF21

El FGF21 de tipo salvaje tiene una vida media relativamente corta, y en algunos casos esto puede no ser deseable para el uso de FGF21 de tipo salvaje como terapéutica. Además, los métodos tradicionales de extender la vida media, tales como PEGilación del polipéptido están limitados por el número y ubicación de los sitios de PEGilación adecuados en la secuencia de FGF21. En la secuencia del polipéptido de tipo salvaje FGF21 hay siete sitios naturales de PEGilación, a saber, el grupo alfa amino, cuatro residuos de lisina, y dos residuos de cisteína. Estos sitios no son ideales para la PEGilación porque la molécula de PEG puede afectar negativamente a la capacidad de FGF21 para obtener su estructura nativa, o pueden afectar negativamente la interacción entre el FGF21 y su receptor o beta-Klotho. Además, con la excepción del grupo alfa amino, estos residuos reactivos no permiten la PEGilación específica de un sitio en una sola ubicación de orientación. En consecuencia, un estudio dirigido y centrado se llevó a cabo para identificar los residuos dentro del polipéptido FGF21 de tipo salvaje que podrían ser mutados a un residuo adecuado para la modificación química. Las consideraciones en el estudio incluyeron la ubicación de los residuos en la secuencia de FGF21, así como su posición sobre la superficie de la proteína.

Dos estrategias diferentes se emplearon en un esfuerzo por identificar los residuos individuales en el polipéptido FGF21 de tipo salvaje que serían convenientes para la mutación de un residuo útil para la modificación química, que se describe en este documento.

SS

EJEMPLO 3.A

Candidatos de mutaciones identificadas usando un modelo de homología

En la primera estrategia, un modelo de homología se usó en un enfoque racional sistemático de ingeniería de proteínas para identificar los residuos con una alta probabilidad de tener cadenas laterales expuestas a la superficie que era probable que toleraran la PEGilación sin interferir con la actividad de FGF21. Dado que no se han publicado las estructuras de rayos X o RMN de FGF21 que se podrían usar para identificar dichos residuos, se obtuvo una estructura cristalina de Rayos X de alta resolución (1.3 Å) de FGF19 (1PWA) a partir del banco de datos de proteínas (PDB) para crear un modelo 3D de homología de FGF21 mediante el uso de un software de modelado MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group; Montreal, Quebec, Canadá). FGF19 se eligió como una plantilla, ya que entre las proteínas depositadas en PDB, FGF19 es la proteína más estrechamente relacionada con FGF21 en términos de homología de secuencia de aminoácidos.

El modelo de homología de FGF21 se extendió luego a representar a FGF-21 unido a un receptor de FGF. Este modelo se usó para identificar los residuos que probablemente se verían expuestos en la superficie de la molécula de FGF21 y disponibles para la reacción con una fracción de un polímero activado (*por ejemplo*, PEG), mientras que evitaba los residuos que pudieran interferir con la interacción de FGF21 con su receptor. También se hicieron consideraciones para la conservación de la secuencia de los residuos entre las especies, así como las propiedades bioquímicas de la cadena lateral de origen. Los residuos identificados como buenos candidatos por esta detección se clasificaron en función de la probabilidad estimada de PEGilación exitosa de este sitio con la mínima interrupción de la actividad. Los residuos en el Grupo A reflejan los mejores candidatos, y los residuos en el Grupo D reflejan los candidatos viables pero menos preferidos. El Grupo A incluye N121, H125, H112, R77, H87, E37 y K69. El Grupo B incluye R126, G113, D79, E91, D38, D46 y G120. El Grupo C incluye S71, D89, L86, T70, G39, T40, R36, P49, S48, S123, K122, A81, A111, E110 y R96. Finalmente, el Grupo D incluye Q18, R19, A26, Q28, E34, A44, A45, E50, L52, Q54, L55, K59, G61, L66, V68, R72, P78, G80, Y83, S85, F88, P90, A92, S94, L98, E101, D102, Q108, L114, H117, P119, P124, D127, P128, A129, P130, R131, y P140.

Además, los sitios potenciales de PEGilación dentro de los segmentos amino y carboxi-terminal de la molécula se identificaron con base en las alineaciones de secuencias y las propiedades bioquímicas de las cadenas laterales, ya que no está disponible los datos estructurales en tres dimensiones para estas porciones de la molécula. Los residuos que se creyeron que eran los más apropiados para la mutación se identificaron y posteriormente se agruparon de acuerdo a qué tan bien cumplen los

56

residuos con un conjunto de criterios de selección. Con respecto al N-terminal de la secuencia del polipéptido FGF21, los residuos de 1-13 se evaluaron, y D5 se determinó que era el mejor candidato para la mutación, con los residuos de H1, P2, I3, P4 y S6 también se determinó que era viable. En lo que respecta al C-terminal de la secuencia del polipéptido FGF21, los residuos 141-181 se evaluaron, y los residuos Y179 y R175 se determinó que eran los mejores candidatos para la mutación, con residuos de P143, P171, S172, Q173, G174, S176, P177, S178, A180, y S181 que formaban otro grupo de candidatos, y los residuos P144, A145, P147, E148, P149, P150, I152 A154, Q156 and G170 que formaban un tercer grupo de candidatos para la mutación.

EJEMPLO 3.B

mutantes FGF21 Generados Mediante la Eliminación de sitios de unión al polímero de origen naturales no deseados

La segunda estrategia empleada, es una química de conjugación específica de amino para el acoplamiento del PEG al FGF21. La doble PEGilación selectiva de un sitio, de posibles conjugaciones vacuologénicas puede reducir significativamente su potencial vacuologénico (*ver, por ejemplo*, la patente de los Estados Unidos núm. 6,420,339). En consecuencia, en un aspecto de la presente invención, la doble PEGilación selectiva de un sitio de FGF21 se logró mediante la mutación de la proteína para que sólo dos grupos amino primarios queden para la PEGilación.

La proteína FGF21 contiene cuatro residuos lisina y diez argininas como se destacó en negrita (residuos R y K) y subrayado (residuos K) en la secuencia de tipo salvaje de FGF21 (sec. con núm. de ident.: 4). Los dos residuos de cisteína de origen natural se destacan en negrita y cursiva:

HPIPDSSPLLQFGGQVR**R**QRYLYTDDAQQTEAHLEI**RED**GTVGGAADQSPE
 SLLQL**K****A**L**K**PGVIQILGV**K**TS**R**FLCQRPDGALYGSLHFDPE**ACS**F**R**ELLLE
 DGVNVYQSEAHGLPLHLPGN**K**SPHRDPAP**R**GPARFLPLGLPPAPPEPPGI
 LAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS sec. con núm. de ident.: 4

Las cuatro lisinas de origen natural se mutaron primero en argininas para crear una molécula parental que contenía sólo un grupo amina primaria como un grupo α -amino en el extremo N-terminal. Esta se probó para la actividad *in vitro* y se encontró que era completamente activo. A continuación, las argininas seleccionadas se sustituyeron paso a paso por lisina para crear hasta diez análogos que contienen un segundo grupo amino primario para PEGilación en varias posiciones en la molécula de FGF21. Un examen del modelo de homología de FGF21 unido a su receptor (como se describió en el Ejemplo 3A) permitió la clasificación de los sitios de conjugación propuestos en función de su

5A

proximidad a la interfaz del receptor putativo. Los sitios que parecían enterrados no se trataron.

Las diversas posiciones se clasificaron y se caracterizaron de la siguiente manera:

- (a) Los sitios que están expuestos al solvente y distales a la interfaz de receptor: R36, R77, K122 & R126, (b) Los sitios que están expuestos solvente y próximos a la interfaz de receptor: K56, K59, K69, R72 & R175, (c) Los sitios que se encuentran enterrados: R17, R19, R131 & R135.

Los constructos finales, cada uno con un solo grupo α -amino y ϵ -amino se purificaron, y se probaron para la actividad, tanto antes como después de la conjugación con PEG como se describió en los Ejemplos 9 (conjugación) y 10 (ensayo de actividad *in vitro*).

Ejemplo 4

Identificación de mutantes FGF21 que comprenden una única mutación

Un resumen de los mutantes FGF21 que comprenden una única mutación que se generó a través del enfoque de ingeniería de proteínas racional que se describió antes en el Ejemplo 3.A y 3.B se proporcionó en la Tabla 3. Estos mutantes individuales proporcionan e incorporan un sitio no-natural de unión al polímero, en particular, un residuo cisteína o lisina. Las cadenas laterales de estos residuos son especialmente adecuadas para la modificación química por la unión de un polímero, tal como por ejemplo una molécula de PEG. Se reconoció que, además del sitio de unión al polímero no natural introducido, un polímero podría opcionalmente unirse al N-terminal de la proteína, como se desea.

Dado que los residuos introducidos se diseñaron para mantener los niveles de la actividad biológica de FGF21 de tipo salvaje, se esperaba que estos polipéptidos mutantes FGF21 mantuvieran la actividad biológica de FGF21 y aún así proporcionaran uno o más sitios de unión al polímero no-naturales. Después de la modificación química (*por ejemplo*, PEGilación) se esperaba que estos mutantes tuvieran una vida media más larga *in vivo* que FGF21 de tipo salvaje, que mantienen al mismo tiempo niveles significativos de actividad biológica *in vivo* de tipo salvaje.

Los números de las posiciones específicas para la mutagénesis se presentan en la Tabla 5 y corresponden a la posición de residuos en la proteína madura FGF21, que consta de 181 residuos de aminoácidos. Las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos mutantes FGF21 que se listaron en la Tabla 5 se prepararon mediante el uso de las técnicas descritas a continuación.

TABLA 5
Polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden una sola mutación.

Número del residuo	Salvaje	Mutación	
36	R	k	R36K
37	e	C	E37C
38	d	C	D38C
46	d	C	D46C
56	k	R	K56R
60	k	R	K60R
91	e	C	E91C
69	k	C	K69C
69	k	R	K69R
72	R	k	R72K
77	R	C	R77C
77	R	k	R77K
79	d	C	D79C
86	H	C	H86C
91	e	C	E91C
112	H	C	H112C
113	g	C	G113C
120	g	C	G120C
121	N	C	N121C
122	k	R	K122R
125	H	C	H125C
126	R	C	R126C
126	R	k	R126K
171	p	g	P171G
175	R	C	R175C
175	R	k	R175K
170	g	C	G170C
179	Y	C	Y179C

Ejemplo 5
Identificación de mutantes FGF21 que comprenden dos mutaciones

Un análisis más detallado del modelo de homología y los datos obtenidos a partir de los mutantes individuales de cisteína se realizó con el fin de identificar las combinaciones de mutantes que proporcionarían dos sitios no-naturales de unión al polímero. A raíz de la modificación química, estos mutantes FGF21 tienen dos polímeros (por ejemplo, moléculas PEG) unidas al polipéptido en las localizaciones deseadas. Al igual que con todos los polipéptidos mutantes FGF21 de la presente invención, un polímero también se puede conectar al N-terminal del polipéptido, según la naturaleza del propio polímero. Un dibujo que representa a un mutante de FGF21 doblemente PEGilado se mostró gráficamente en la Figura 1.

Un resumen de mutantes FGF21 que comprenden dos mutaciones que se generaron a través de este enfoque racional de ingeniería de proteínas se proporcionó en la Tabla 6. Estos mutantes dobles incorporan un sitio no-natural de unión al polímero, en

59

particular una cisteína. Las cadenas laterales de estos residuos son especialmente adecuadas para la modificación química por la unión de un polímero, tal como por ejemplo una molécula de PEG. Se reconoció que, además del sitio de unión al polímero no natural introducido, un polímero opcionalmente se puede unir al N-terminal de la proteína, si lo desea.

Dado que los residuos que se introdujeron se diseñaron para mantener la actividad biológica de FGF21, estos mutantes FGF21 se esperaba que preservaran la actividad biológica de FGF21 y aún así proporcionaran uno o más sitios no-naturales de unión al polímero. Después de la modificación química (*por ejemplo*, PEGilación) se esperaba que estos mutantes tuvieran una vida media más larga que la del FGF21 de tipo salvaje, que mantienen al mismo tiempo considerable potencia *in vivo*.

Los números de las posiciones presentadas en la Tabla 6 corresponden a la posición del residuo en la proteína FGF21 madura, que consta de 181 residuos de aminoácidos. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos mutantes FGF21 que se enumeraron en la Tabla 6 a continuación, se prepararon mediante el uso de las técnicas descritas a continuación.

TABLA 6

Polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden dos mutaciones

Residuo 1	Salvaje	Mutación	Residuo 2	Salvaje	Mutación	
37	e	C	77	R	C	E37C,R77C
120	g	C	125	H	C	G120C, H125C
77	R	C	91	e	C	R77C, E91C
77	R	C	125	H	C	R77C, H125C
91	e	C	125	H	C	E91C, H125C
77	R	C	120	g	C	R77C, G120C
37	e	C	91	e	C	E37C, E91C
91	e	C	175	R	C	E91C, R175C
37	e	C	175	R	C	E37C, R175C
91	e	C	120	g	C	E91C, G120C
37	e	C	120	g	C	E37C, G120C
77	R	C	175	R	C	R77C, R175C
37	e	C	125	H	C	E37C, H125C
37	e	C	69	k	C	E37C, K69C
69	k	C	91	e	C	K69C, E91C
120	g	C	175	R	C	G120C, R175C

69	k	C	120	g	C	K69C, G120C
69	k	C	125	H	C	K69C, H125C
69	k	C	77	R	C	K69C, R77C
125	H	C	175	R	C	H125C, R175C
69	k	C	175	R	C	K69C, R175C
37	e	C	170	g	C	E37C, G170C

Ejemplo 6

Identificación de mutantes FGF21 que comprenden tres mutaciones

5 Como se describió anteriormente, sitios de unión al polímero de origen no natural se pueden introducir en la secuencia del polipéptido FGF21 de tipo salvaje. Esto brinda la oportunidad de modificación química del sitio selectivo en los lugares deseados en el polipéptido. Además, ya ha sido determinado que los residuos P171 en la secuencia de FGF21 de tipo salvaje es susceptible a la degradación proteolítica. En consecuencia, mediante la introducción de combinaciones de las modificaciones anteriores, además de una mutación en la posición P171, se pueden generar moléculas de FGF21 que tienen tanto una mayor estabilidad proteolítica y sitios específicos de unión al polímero.

15 Un análisis más detallado del modelo de homología se realizó con el fin de identificar las combinaciones de mutantes que proporcionan dos sitios de unión al polímero no-naturales. A raíz de la modificación química, estos mutantes tendrían dos polímeros (por ejemplo, moléculas PEG) unidos al polipéptido en las localizaciones deseadas. Al igual que con todos los polipéptidos mutantes FGF21 de la presente invención, un polímero también se puede conectar al N-terminal del polipéptido, según la naturaleza del propio polímero. El análisis incluyó la evaluación de una mutación en la posición P171, además de los dos sitios de unión al polímero que se introdujeron, el cual se diseñó para mejorar la estabilidad proteolítica del polipéptido mutante FGF21, y proporcionar sitios de unión al polímero seleccionados y mayor estabilidad proteolítica, mientras que en el mismo tiempo mantener o aumentar la actividad biológica *in vivo* del FGF21 de tipo salvaje.

25 En un estudio paralelo, una selección de un subconjunto de mutaciones individuales de la Tabla 5, que se presentó en el Ejemplo 4, se combinaron con la mutación de aumento de la estabilidad P171 con el fin de PEGilar el sitio selectivamente, tanto en el α -aminoácido de N-terminal y en la mutación de cisteína introducida mediante el uso de químicos mezclados sitios selectivos como se describió previamente (ver la patente de los Estados Unidos núm. 6,420,339, incorporada en la presente como referencia). Estos dobles mutantes se designaron R77C/P171G y H125C/P171G y son

61

ejemplares de cualquier otra combinación que se pueda contemplar que usen las mutaciones que se divulgan en la Tabla 5 del Ejemplo 4.

Un resumen de los mutantes FGF21 que comprende dos mutaciones, además de una mutación en el sitio P171, que se generaron a través de este enfoque racional de ingeniería de proteínas se proporciona en la Tabla 7. Estos mutantes incorporar dos sitios de no-naturales de unión al polímero, especialmente cisteína. Las cadenas laterales de estos residuos son especialmente adecuadas para la modificación química por la unión de un polímero, tal como por ejemplo una molécula de PEG. Se reconoció que, además del sitio de unión al polímero no natural introducido, un polímero podría opcionalmente unirse al N-terminal de la proteína, como se desea. Las triples mutantes FGF21 que se describieron incluyen no sólo los sitios introducidos de unión al polímero que se describieron anteriormente, sino también una estabilidad proteolítica que induce la mutación en la posición 171. A raíz de la modificación química de la triple mutante de FGF21, esta combinación de mutaciones cumple la función de mejorar la vida media de FGF21 a través de la asociación de dos polímeros (*por ejemplo*, moléculas PEG) con la secuencia del polipéptido, así como mejorar la vida media a través de la eliminación de un sitio de escisión proteolítica.

Dado que los residuos introducidos se diseñaron para mantener los niveles de actividad biológica *in vivo* de FGF21 de tipo salvaje, se esperaba que estos mutantes FGF21 mantuvieran la actividad biológica de FGF21 y aún así proporcionaran sitios únicos de unión al polímero no-natural. Después de la modificación química (*por ejemplo*, PEGilación) se esperaba que estos mutantes tuvieran una vida media más larga que la de FGF21 de tipo salvaje, que mantienen al mismo tiempo niveles significativos de actividad biológica *in vivo* de tipo salvaje.

Los números de las posiciones que se muestran en la Tabla 7 corresponden a la posición de residuos en la proteína FGF21 madura, que consiste de una secuencia 181 residuos de aminoácidos. El ácido nucleico que codifica los polipéptidos mutantes FGF21 que se muestran en la Tabla 7 se preparó mediante el uso de las técnicas descritas en este documento.

TABLA 7
Polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden tres mutaciones

Residuo 1	Salvaje	Mutación	Residuo 2	Salvaje	Mutación	Residuo 3	Salvaje	Mutación	
37	e	C	77	R	C	171	p	g	E37C. R77C. P171G
91	e	C	125	H	C	171	p	g	E91C. H125C. P171G
77	R	C	120	g	C	171	p	g	R77C. G120C. P171G
37	e	C	91	e	C	171	p	g	E37C. E91C. P171G
91	e	C	175	R	C	171	p	g	E91C. R175C. P171G
37	e	C	175	R	C	171	p	g	E37C. R175C. P171G
91	e	C	120	g	C	171	p	g	E91C. G120C. P171G
37	e	C	120	g	C	171	p	g	E37C. G120C. P171G
77	R	C	175	R	C	171	p	g	R77C. R175C. P171G
37	e	C	125	H	C	171	p	g	E37C. H125C. P171G

5

EJEMPLO 7

Preparación y expresión de polipéptidos mutantes FGF21

Los constructos que codifican los mutantes FGF21 que se enumeran en las Tablas 3 (mutaciones únicas), 4 (mutaciones dobles) y 5 (mutaciones triples, las mutaciones, *es decir*, mutaciones dobles + P171G), en lo adelante "mutantes FGF21" en este ejemplo, se prepararon mediante amplificación por PCR del vector de expresión del FGF21 tipo salvaje tal como se describe a continuación (la construcción del vector de expresión del FGF21 tipo salvaje se describió en el Ejemplo 1). El objetivo de estos experimentos fue la generación de mutantes FGF21 que comprendieran uno o más sitios de unión al polímero no-natural, y en algunos casos son resistentes a la proteólisis. Se esperaba que las formas químicamente modificadas de estos mutantes FGF21 exhibieran una mayor vida media, y en algunos casos también resistencia a la proteólisis.

Los constructos de mutantes FGF21 se prepararon mediante el uso de cebadores con secuencias que son homólogas a las regiones corriente arriba y corriente abajo de un codón (o codones) que será mutado. Los cebadores que se usaron en tales reacciones de amplificación como también proporcionaron aproximadamente 15 nucleótidos de la

63

secuencia de superposición que permiten la recircularización del producto amplificado, es decir, el vector completo que tenía el mutante deseada.

Un construcción ejemplar de mutante de FGF21, que codificaba un mutante de FGF21 que tenía un residuo de ácido glutámico en la posición 170 en lugar del residuo de glicina nativo (*es decir*, un polipéptido mutante FGF21, G170E) se elaboró mediante el uso de los cebadores que se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8
Cebadores de PCR para preparar el mutante FGF21 ilustrativo

Cebador	Secuencia	sec. con núm. de ident.:
Sentido	5'-ATGGTGGAACTTCCCAGGGCCGAAGC-3'	29
	CTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCA	30
	GAGGAGCCTGGGAGACTCGTACCACCCTGGAAGGGTCCCGGCTTCGGGGT	31
Antisentido	5'-GGAAGGTCCACCATGCTCAGAGGGTCCGA-3'	32

Los cebadores que se muestran en la Tabla 6 permiten la sustitución del residuo de glicina con un residuo de ácido glutámico como se muestra abajo, en donde la secuencia superior es el cebador sentido (sec. con núm. de ident.: 29), las secuencias de segundo y tercero (sec. con núm. de ident.: 30 y 31) son partes de una expresión FGF21 construir, y la secuencia de cuarto es el primer antisentido (sec. con núm. de ident.: 32):

5'-ATGGTGGAACTTCCCAGGGCCGAAGC
CTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCA
GAGGAGCCTGGGAGACTCGTACCACCCTGGAAGGGTCCCGGCTTCGGGGT
AGCCTGGGAGACTCGTACCACCTTGGGAAGG-5'

Los constructos de mutantes FGF21 se prepararon mediante el uso de esencialmente de las condiciones de PCR que se describieron en el Ejemplo 1. Los productos de amplificación se digirieron con la endonucleasa de restricción DpnI, y luego se transformaron en células competentes. Los clones resultantes se secuenciaron para confirmar la ausencia de errores generados por la polimerasa.

Los mutantes FGF21 se expresaron mediante la transformación de células competentes, BL21 (DE3) o BL21 Star (Invitrogen, Carlsbad, CA), con la construcción que codificaba un mutante particular. Los transformantes se crecieron durante la noche con aireación limitada en medio TB suplementado con 40 mg/ml de kanamicina, se airearon la mañana siguiente, y después de un corto período de recuperación, se indujeron

64

en IPTG 0.4 mM. Polipéptidos mutantes FGF21 se cosecharon por centrifugación 18-20 horas después de la inducción.

Como resultado del sistema de expresión bacteriano empleado, los polipéptidos mutantes FGF21 se expresaron con un residuo de metionina N-terminal.

5

EJEMPLO 8

Purificación de FGF21 y polipéptidos mutantes FGF21 de bacterias

En los ejemplos que siguen, polipéptidos mutantes FGF21 se expresaron en un sistema de expresión bacteriana. Después de la expresión, la cual se describió en el
10 Ejemplo 7, polipéptidos mutantes FGF21 se purificaron como se describió en este ejemplo, a menos que se indique lo contrario.

Para purificar el polipéptido mutante de FGF21 de cuerpos de inclusión bacterianos, cuerpos de inclusión doblemente lavados (DWIB) se solubilizaron en un tampón de solubilización que contiene clorhidrato de guanidina y DTT en tampón Tris a
15 pH 8.5 y luego se mezcló durante una hora a temperatura ambiente, y la mezcla de solubilización se añadió a un buffer de replegamiento que contenía urea, arginina, cisteína, y clorhidrato de cisteamina a pH 9.5 y luego se mezcló durante 24 horas a 5° C (ver, por ejemplo, Clarke, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 157-63; Mannall y otros, 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1523-34; Rudolph y otros, 1997, "Folding Proteins," en
20 *Protein Function: A Practical Approach* (Creighton, ed., Nueva York, IRL Press), pp 57-99; y Ishibashi y otros, 2005, *Protein Expr. Purif.* 42: 1-6).

Después de solubilización y replegamiento, la mezcla se filtró a través de un filtro de 0.45 micras. El grupo de replegamiento se concentró alrededor de 10 veces con un casete Pall Omega de un corte de peso molecular de 5 kDa a una presión transmembrana
25 (PTM), de 20 psi, y se diafiltró con 3 volúmenes de columna de Tris 20 mM, pH 8.0 a una PTM de 20 psi.

La muestra aclarada se sometió a cromatografía de intercambio de aniones (AEX) mediante el uso de la resina Q Sepharose HP. Un gradiente salino lineal de NaCl de 0 a 250 mM en Tris 20 mM se corrió a un pH de 8.0 a 5° C. Las fracciones del pico se
30 analizaron por SDS-PAGE y se agruparon.

El grupo que eluyó de AEX se sometió a cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) con una resina de Fenil Sepharosa HP. La proteína se eluyó con un gradiente lineal decreciente de sulfato de amonio de 0.6 M a 0 M con Tris 20 mM a pH 8.0 y temperatura ambiente. Las fracciones del pico se analizaron por SDS-PAGE (Laemmli, 1970, *Nature*
35 227: 680-85) y se agruparon.

El grupo de HIC se concentró con un casete de 0.2 m² Pall Omega de corte de peso molecular de 5 kDa, a 7 mg/ml a una PTM de 20 psi. El concentrado se filtró con 5

65

volúmenes de columna de Tris 20 mM, pH 8.0 a una PTM de 20 psi, y el concentrado recuperado se diluyó a aproximadamente 5 mg/ml. Por último, la solución se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.22 μ m.

5

Ejemplo 9

Modificación química de mutantes FGF21

Las variantes de FGF21 que tienen cisteína sustituida en las posiciones seleccionadas que se muestran en las Tablas 3-5 se produjeron como se describió en el Ejemplo 7, y las moléculas se sometieron a una reacción de PEGilación con una metoxi-
10 PEG -maleimida de 20 kDa. A menos que se indique lo contrario, todos los polipéptidos FGF21 de tipo salvaje y mutante PEGilados que se divulgan en la presente comprenden uno o más polímeros de metoxi-PEG -maleimida de 20 kDa.

Las moléculas FGF21 parcialmente purificadas se redujeron a continuación, mediante el uso de 5 equivalentes molares de TCEP durante 30 minutos a 25 °C. Al
15 FGF21 reducido se le cambió el tampón a imidazol 10 mM, pH 7.5 mediante el uso de una columna de Sephadex G25M de GE Healthcare. El FGF21 con el tampón intercambiado se hizo reaccionar a continuación, con 5 equivalentes molares de metoxi-PEG -maleimida de 20 kDa durante 30 minutos a 25°C. La mezcla de reacción resultante se sometió luego a cromatografía de intercambio iónico para aislar las especies mono
20 PEGilados a partir de moléculas multi PEGilados y sin PEGilado. La mayoría de los polipéptidos mutantes FGF21 reaccionó bien con la metoxi-PEG -maleimida y produjeron principalmente productos mono-PEGilado en alto rendimiento (Figuras 2 y 3).

Para la producción de las moléculas ancladas, moléculas de FGF21 parcialmente purificadas se redujeron con 5 equivalentes molares de TCEP durante 30 minutos a 25°C.
25 Al FGF21 reducido se le cambió el tampón a imidazol 10 mM, pH 7.5 mediante el uso de una columna de Sephadex G25M de GE Healthcare. El FGF21 con el tampón intercambiado se hizo reaccionar a continuación, con el 0.45 equivalentes molares de bis-maleimida PEG de 20 kDa durante 60 minutos a 4 °C. La mezcla de reacción resultante se sometió luego a la cromatografía de intercambio iónico para aislar la molécula anclada
30 de otros productos de la reacción indeseables. Con frecuencia un paso purificación adicional de intercambio iónico se requirió, el cual se llevó a cabo mediante la dilución del primer grupo de intercambio iónico en aproximadamente 4 volúmenes de agua y volviéndolo a aplicar a la columna de intercambio iónico.

Por otra parte el acoplamiento específico de amina al N-terminal se logró por
35 alquilación reductiva mediante el uso de metoxi PEG propionaldehído como se describió previamente (*ver* la patente de los Estados Unidos núm. 5,824,784). En resumen, el mutante de FGF21 a aproximadamente 2 mg/ml se hizo reaccionar toda la noche a 4° C,

con un exceso molar de 5 veces de MPEG-propionaldehído de 20kD en tampón acetato pH 5.5 y cianoborohidruro de sodio 10 mM. PEGilación N-terminal de cualquiera de las moléculas de FGF21 de tipo salvaje y mutante que se describieron en la presente se pueden lograr mediante el uso de esta estrategia.

5 Cuando la doble PEGilación específica de amina se requirió tanto en el N-terminal y en una lisina mutante, se usó metoxi PEG-NHS (éster N-hidroxisuccinimidilo). En resumen, el mutante FGF21 a aproximadamente 2 mg/ml se hizo reaccionar durante 2 horas a 4° C con un exceso molar de 5 veces (PEG: grupo amino) de MPEG-NHS de 20kD en tampón bicina pH 7.5.

10 Al aplicar un enfoque de mezcla química a los mutantes FGF21 doblemente PEGilados, tanto en el N-terminal y un mutante en posición Cys, tanto metoxi PEG propionaldehído y metoxi- PEG maleimida se usaron de forma secuencial como se describió previamente (*ver* la patente de los Estados Unidos núm. 6,420,339). En resumen, mutante de FGF21 de aproximadamente 2 mg/ml se hizo reaccionar durante 15 aproximadamente 2 horas con un exceso molar de 1.5 veces de MPEG-maleimida de 20kD en tampón fosfato a pH 6.5 a 4° C. el pH se ajustó aproximadamente a pH 5 y un exceso de 5 veces de MPEG- propionaldehído de 20kD se agregó con cianoborohidruro de sodio 10 mM. La reacción final se le permitió continuar a 4° C durante la noche.

La purificación de todas las diferentes mezclas de reacción fue por cromatografía 20 de intercambio aniónico en tampón Tris a pH 8 como se describió anteriormente.

Ejemplo 10

Actividad *in vitro* de polipéptidos mutantes FGF21 y polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente

25 Los polipéptidos mutantes FGF21 PEGilados se sometieron a un ensayo *in vitro* para evaluar su actividad, en comparación con la forma no PEGilada del polipéptido mutante FGF21 y el FGF21 PEGilado en N-terminal.

Uno de los objetivos de estos experimentos fue identificar polipéptidos mutantes FGF21 y polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente que conservan 30 actividad FGF21 en una prueba *in vitro*. El ensayo de ELK-luciferasa se realizó mediante el uso de un sistema de células renales humanas recombinantes 293T, en el cual las células 293T sobreexpresan beta-Klotho y construcciones del reportero de luciferasa. Beta-Klotho es un co-receptor que requiere FGF21 para la activación de sus receptores de FGF. Los receptores de FGF usados en este ensayo son los niveles endógenos de los 35 receptores de FGF que se expresan en células renales de 293T. Las construcciones del reportero de luciferasa contienen secuencias que codifican GAL4-ELK1 y un reportero de luciferasa impulsado por un promotor que contiene cinco copias en tándem del sitio de

62

unión de Gal4 (5xUAS-Luc). La actividad luciferasa se regula por el nivel de Erk/ELK1 fosforilado, y se usa para controlar y cuantificar indirectamente la actividad FGF21.

Ensayos de ELK-luciferasa se realizaron mediante el cultivo de las células 293T en presencia de diferentes concentraciones de FGF21 de tipo salvaje o del polipéptido mutante FGF21 durante 6 horas, y posteriormente se probaron los lisados celulares para la actividad luciferasa. Figuras 4-6 y Tablas 3-5 resumen los resultados *in vitro* obtenidos para varios ejemplares polipéptidos mutantes FGF21, se incluyen los que tienen uno, dos o tres mutaciones.

EJEMPLO 10.A

Los valores EC50 para polipéptidos mutantes FGF21 PEGilados que comprenden una mutación

La Tabla 9 resumen los valores de EC50 de diferentes polipéptidos mutantes FGF21 que comprende dos mutaciones, las cuales introducen un sitio de unión al polímero no-natural en un lugar específico, conocido.

Varios polipéptidos mutantes FGF21 se generaron y la actividad se determinó en el ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa descrito en la presente. La Tabla 9 resume los datos obtenidos:

Tabla 9

Sumario de EC50 para polipéptidos mutantes FGF21 PEGilados que comprenden una mutación

Mutación	EC50 (nM)	Salvaje EC50 (nM)	N-PEG20 EC50 (nM)
H125C	4.5	2.8	36.7
R77C	4.9	3.9	43.3
K69C	5.3	2.8	36.7
G120C	6.0	2.8	36.7
E37C	6.9	3.9	43.3
R175C	7.9	0.9	21.5
E91C	8.3	3.9	43.3
N121C	9.2	3.9	43.3
R126C	10.0	2.8	36.7
G113C	12.0	3.9	43.3
D38C	13.1	2.8	36.7
D79C	20.4	3.4	40.0
D46C	27.8	3.9	43.3
Y179C	287.1	1.1	21.5

La Tabla 9 resume el efecto de PEGilación en la actividad *in vitro* de alguno de los diversos polipéptidos mutantes FGF21 de la invención.

Las figuras 4, 5 y 6 representan gráficamente los resultados y los valores de EC50 para varias mutantes FGF21 PEGilado que comprende un único punto de mutación. Las figuras 4 y 5 contienen datos sobre varios de los mutantes FGF21 para los que se presentaron los datos en la Tabla 9. Más concretamente, la gráfica superior de la Figura 4 muestra los resultados del ensayo de ERK-luciferasa que se realizó en los mutantes PEGilados E37C, R77C, E91C y FGF21 de tipo salvaje PEGilado en N-terminal, así como FGF21 no PEGilado. En el gráfico inferior de la Figura 4, los datos se presentaron sobre los mutantes PEGilados G113C, N121C, D46C y FGF21 de tipo salvaje PEGilado en N-terminal, así como FGF21 de tipo salvaje no PEGilado.

Volviendo a la Figura 5, en el gráfico superior se presentan los datos para los mutantes H125C, G120C, R126C y FGF21 de tipo salvaje PEGilado en N-terminal, así como de FGF21 de tipo salvaje no PEGilado. En el gráfico inferior, los datos se presentan para los mutantes D79C, D38C y FGF21 de tipo salvaje PEGilado en N-terminal, así como FGF21 de tipo salvaje no PEGilado.

Continuando con la gráfica superior de la Figura 6, los datos gráficos se presentan para los mutantes K69C y D79C PEGilados, así como FGF21 de tipo salvaje PEGilado en N-terminal, y FGF21 de tipo salvaje no PEGilado. En el gráfico inferior de la Figura 6, se presentan los datos para los mutantes R175C y Y179C PEGilados y FGF21 de tipo salvaje PEGilado en N-terminal, así como FGF21 de tipo salvaje no PEGilado. Sorprendentemente, muchas de estas moléculas tienen actividad *in vitro* similar a la de la molécula no PEGilada.

25

EJEMPLO 10.B

Valores EC50 para una selección de mutantes Arg/Lys de FGF21

Como se describió en el Ejemplo 3, una serie de polipéptidos mutantes FGF21 se generó, en los cuales los sitios de unión al polímero de origen natural (por ejemplo, sitios PEGilación) se retiraron por mutagénesis. En estos mutantes FGF21 los grupos de Lys reactivos se mutaron primero en arginina, dejando sólo el grupo N-terminal α -amino para PEGilación. A continuación, se seleccionaron los residuos de arginina, ya sea nativa o mutante, se convirtieron uno por uno a lisina, lo que introdujo así un sitio de PEGilación secundaria en las posiciones definidas en la superficie de FGF21. Uno de los objetivos de esta estrategia era generar polipéptidos mutantes FGF21 en los cuales un polímero (por ejemplo, una molécula PEG) sería conjugado en uno o más lugares específicos conocidos.

35

Varios polipéptidos mutantes arginina/lisina de FGF21 se generaron y la actividad

se determinó en el ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa descrito en la presente. La Tabla 10 resume los datos obtenidos:

5 **TABLA 10**
Sumario de EC50 para polipéptidos mutantes FGF21 PEGilados que comprenden mutaciones lisina/arginina

Construeto	Tipo de PEG	Actividad <i>In Vitro</i> EC ₅₀ (nM)
FGF21 Nativo	núm. PEG	3
FGF21 Nativo (N-terminal)	1 x 20k	43.3
FGF21 Nativo (aleatorio)	2 x 20k	200
FGF21(todo K a todo R)	1 x 20k	ND
FGF21(todo K a todo R, R36K)	2 x 20k	73
FGF21(todo K a todo R, R77K)	2 x 20k	175
FGF21(K56/59/69R)	2 x 20k	500
FGF21(K todo R, R126K)	2 x 20k	38
FGF21(K59R/K69R/K122R)	2 x 20k	499
FGF21(K56R/K69R/K122R)	2 x 20k	215
FGF21(K56R/K59R/K122R)	2 x 20k	531
FGF21(todo K a todo R, R72K)	2 x 20k	>1000
FGF21(todo K a todo R, R175K)	2 x 20k	>1000

Ejemplo 10.C
Valores de EC50 para una selección de polipéptidos mutantes FGF21 PEGilados que comprenden dos mutaciones

10 La actividad de un número de polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden dos mutaciones se examinó también en el ensayo de ERK-luciferasa descrito en la presente. Estos mutantes se diseñaron para introducir dos sitios no-naturales de unión al polímero (en forma de un residuo de cisteína) y una mutación que proporcionara una mayor
15 estabilidad proteolítica (P171G) en la secuencia de FGF21 de tipo salvaje.

 Varios polipéptidos mutantes FGF21 se generaron y la actividad se determinó en el ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa descrito en la presente. Los valores de EC50 de los

experimentos se muestran a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11

Valores de EC50 para una selección de polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente que comprenden dos mutaciones

5

Mutaciones	EC50 (nM)
FGF21 Nativo	3
PEG20K N-term	37
E37C, R77C	21
G120C, H125C	23
R77C, E91C	26
R77C, H125C	30
E91, H125C	32
R77C, G120C	34
E37C, E91C	36
E91C, R175C	46
E37C, R175C	50
E91C, G120C	54
E37C, G120C	55
R77C, R175C	62
E37C, H125C	64
E37C, K69C	67
K69C, E91C	69
G120C, R175C	118
K69C, G120C	119
K69C, H125C	164
K69C, R77C	180
H125C, R175C	200
K69C, R175C	318
E37C, G170C	163

En paralelo, se prepararon mutantes FGF21 doblemente PEGilados mediante el uso de mutantes de cisteína individuales derivados del Ejemplo 10A, pero también llevaban la mutación P171G de mejora de la estabilidad. Estos mutantes se PEGilaron en sitios selectivos. tanto en el N-terminal y la cisteína diseñada mediante el uso de la

10

21

química de PEGilación mixta como se describió previamente (*ver* la patente de los Estados Unidos núm. 6,420,339). Debido a que la química de PEGilación mixta permite la discriminación entre los sitios de conjugación N-terminal y cisteína, también es posible acoplar, a un sitio de forma selectiva, diferentes polímeros a diferentes sitios. En este caso, una serie de conjugados se prepararon en donde las combinaciones de polímeros de 5kDa, 10kDa y 20 kDa se acoplaron al N-terminal y un polímero de 20 kDa se acopló consistentemente a la cisteína mutante. Esto permitió la evaluación del impacto de PEGilación N-terminal sobre la actividad *in vitro* de FGF21. Estos conjugados se probaron todos en el ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa que se describió en la presente. Los resultados se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12
Valores de EC50 para una selección de polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente que comprenden tres mutaciones

Mutación	Tipo de PEG	EC50 (nM)
R77C, P171G	2 x 20k	64
H125C, P171G	2 x 20k	152
H125C, P171G	1 x 10k, 1 x 20k	65
H125C, P171G	1 x 5k, 1 x 20k	30

15

EJEMPLO 10.D

Valores de EC50 para una selección de polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente que comprenden tres mutaciones

La actividad de un número de polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden tres mutaciones se examinó también en el ensayo de ERK-luciferasa descrito en la presente. Estos mutantes se diseñaron para introducir dos sitios de unión al polímero de origen no natural (en forma de un residuo de cisteína) y una mutación que proporcionara una mayor estabilidad proteolítica (P171G) en la secuencia de FGF21 de tipo salvaje.

Varios polipéptidos mutantes FGF21 se generaron y la actividad se determinó en el ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa descrito en la presente. La Tabla 13 resume los datos obtenidos:

20

25

72

Tabla 13

Valores de EC50 para una selección de polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente que comprenden tres mutaciones

Mutaciones	Tipo de PEG	EC50 (nM)
E37C, R77C, P171G	2X 20 kDa	27
E91, H125C , P171G	2X 20 kDa	37
R77C, G120C , P171G	2X 20 kDa	35
E37C, E91C , P171G	2X 20 kDa	30
E91C, R175C , P171G	2X 20 kDa	155
E37C, R175C , P171G	2X 20 kDa	162
E91C, G120C , P171G	2X 20 kDa	34
E37C, G120C , P171G	2X 20 kDa	35
R77C, R175C , P171G	2X 20 kDa	ND
E37C, H125C , P171G	2X 20 kDa	37

5 Sorprendentemente, los datos indican que la mayoría de estos polipéptidos mutantes FGF21 doblemente PEGilados tienen actividad que supera la molécula mono-PEGilado en N-terminal.

Ejemplo 11

10 Valores de EC50 para una selección de FGF21 moléculas ancladas

Las moléculas ancladas de la presente invención comprenden dos secuencias del polipéptido FGF21 atadas entre sí por una molécula del enlazador. La Figura 7 representa gráficamente un ejemplo de una molécula anclada. Como se describe en la presente, se previó que estas moléculas ancladas proporcionarían una vida media más prolongada, al tiempo que conservarían un nivel deseable de actividad biológica.

15 Se generaron varias moléculas ancladas y la actividad se determinó por el ensayo *in vitro* de ELK-luciferasa que se describió en la presente. Las moléculas ancladas que se generaron comprenden mutantes FGF21 en los que la mutación introduce un sitio de unión del enlazador. Varios de los mutantes FGF21 eran dobles mutantes e incluían la mutación P171G para mejorar la estabilidad proteolítica. Las condiciones y procedimientos para realizar este estudio *in vitro* fueron los mismos que en el Ejemplo 10. La Tabla 14 resume los datos obtenidos:

23

Tabla 14
Valores de EC50 para una selección de FGF21 moléculas ancladas

Mutaciones	Enlazador	EC50 (nM)
H125C, P171G	20 kDa PEG	0.21
R77C, P171G	20 kDa PEG	0.25
G120C, P171G	20 kDa PEG	0.51
E37C, P171G	20 kDa PEG	0.36
R175C, P171G	20 kDa PEG	0.36
E91C, P171G	20 kDa PEG	0.20
G170C	20 kDa PEG	0.47
P171C	20 kDa PEG	0.21

5 Puede parecer de los datos de la Tabla 14 que las moléculas ancladas poseen una sorprendentemente alta actividad *in vitro*, igual o superior a la de la molécula no PEGilada que, por referencia, se determinó que era 0.63.

Ejemplo 12

Actividad *in vivo* de los polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente

10 FGF21 posee una serie de actividades biológicas, que incluyen la capacidad para reducir la glucosa, insulina, triglicéridos o los niveles de colesterol en sangre, reducir el peso corporal, o mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto energético, o la sensibilidad a la insulina. Tras la primera evaluación *in vitro* que se describió en el Ejemplo 10, los polipéptidos mutantes FGF21 PEGilado volvieron a ser analizadas *in vivo* para la actividad de FGF21. Los polipéptidos FGF21 PEGilado se introdujeron en ratones resistentes a la insulina ob/ob, y la capacidad de un determinado polipéptido FGF21 PEGilado para reducir la glucemia se midió. El procedimiento para el trabajo *en vivo* fue el siguiente.

20 El polipéptido FGF21 PEGilado a ser probado se inyectó por vía intraperitoneal en un ratón de 8 semanas de edad ob/ob (Laboratorio Jackson), y se obtuvieron muestras de sangre en diversos puntos temporales después de una sola inyección, *por ejemplo*, 0, 6, 24, 72, 120, y 168 horas después de la inyección. Los niveles de glucosa en sangre se midieron con un glucómetro OneTouch (LifeScan, Inc. Milpitas, CA), y los resultados se expresaron como un porcentaje de cambio de la glucosa en sangre en relación con el nivel basal de glucosa en la sangre (*es decir*, en el tiempo 0).

Los mutantes FGF21 se generaron como se describió en este documento y se modificaron químicamente por la adición de dos moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa, uno en cada uno de los sitios de unión al polímero introducidos, que eran por lo general los residuos de cisteína. Las mutaciones se seleccionaron a fin de proporcionar puntos discretos de unión conocidos para dos moléculas de PEG. La PEGilación de los mutantes FGF21 se logró mediante el uso de los métodos descritos en la presente.

EJEMPLO 12.A

Actividad *in vivo* de FGF21 de tipo salvaje PEGilado en N-terminal

El FGF21 de tipo salvaje que se modificó químicamente por PEGilación en el extremo N-terminal del polipéptido se estudió en un modelo de ratón ob/ob. El FGF21 de tipo salvaje no PEGilado se estudió también en el mismo experimento y se usó PBS como control. Una sola molécula de maleimida metoxi PEG de 20 kDa se usó para FGF21 de tipo salvaje PEGilado en N-terminal. La figura 8 muestra los resultados de este experimento.

Tanto FGF21 de tipo salvaje nativos como de PEGilado en N-terminal redujo los niveles de glucosa en sangre en un 30-40% después de una sola inyección. Sin embargo, los niveles de glucosa en la sangre volvieron a los valores basales después de 24 horas de la inyección de FGF21 nativo de tipo salvaje. Por el contrario, FGF21 de tipo salvaje PEGilado en N-terminal tuvo una actividad sostenida de hipoglucemiante por lo menos durante 72 horas. Los resultados de este estudio indican que la PEGilación de FGF21 de tipo salvaje prolonga los efectos farmacodinámicos de la molécula nativa.

En cuanto a la Figura 9, un estudio de dosis-respuesta se llevó a cabo en un modelo de ratón ob/ob con FGF21 de tipo salvaje, que se PEGiló en N-terminal con una molécula de PEG de 20, 30 y 40kDa. La Figura 9 demuestra que las moléculas de PEG de 30 y 40kDa tienen una eficacia mayor y más prolongada en la reducción de la glucosa en comparación con la molécula de PEG de 20 kDa, lo que indica que el tamaño de PEG se correlacionó positivamente con los efectos farmacodinámicos *in vivo*.

EJEMPLO 12.A.1

Actividad *in vivo* de una selección de polipéptidos mutantes FGF21 modificados químicamente conjugados, tanto en el N-terminal y un sitio de unión al polímero introducido

Varios mutantes FGF21 modificados químicamente se PEGilaron selectivamente en un sitio, tanto en el N-terminal y en un segundo sitio diseñado se estudiaron en un modelo de ratón ob/ob. Estos constructos de FGF21 doblemente PEGilados se PEGilaron

75

todas N-terminal y un segundo sitio que comprende ya sea una lisina diseñada como se describió en el Ejemplo 4 o cisteína diseñada como se describió en el Ejemplo 6.

Un experimento similar se realizó con un grupo diferente de polipéptidos mutantes FGF21 PEGilados. La Figura 10 se compone de dos gráficos que muestran el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en la sangre de los ratones inyectados con vehículo (PBS), o las formas PEGilados de mutantes FGF21 que comprenden mutaciones de unión al polímero, es decir, FGF21 R77C, el cual también se PEGiló en N-terminal y FGF21 R126K, el cual también se PEGiló en N-terminal (gráfico superior), y F77/P171G PEGilado en N-terminal (gráfico inferior), los cuales se PEGilaron también en los sitios introducidos de unión al polímero. Se usaron moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa. Los resultados de este experimento confirman una vez más que los mutantes FGF21 doblemente PEGilados muestran una farmacodinamia elevada en relación con la proteína FGF21 de tipo salvaje con sostenida disminución de la glucosa por lo menos 120 horas.

15

EJEMPLO 12.B

Actividad *in vivo* de una selección de polipéptidos mutante de FGF21 modificados químicamente que comprenden de dos a tres mutaciones

Una serie de polipéptidos mutantes FGF21 con modificaciones químicas se estudiaron en un modelo de ratón ob/ob. Estos mutantes se modificaron químicamente por la adición de dos moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa, una en cada uno de los residuos de cisteína introducidos, y en el caso de polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden una sola mutación en el extremo N del polipéptido. Las mutaciones se seleccionaron a fin de proporcionar puntos de unión discretos conocidos, por una o más moléculas de PEG. Algunos mutantes FGF21 también incluyeron la mutación P171G para mejorar la resistencia proteolítica. Los polipéptidos mutantes FGF21 PEGilado se inyectaron en los ratones y los ratones desangrados a intervalos durante un estudio de nueve días.

25

EJEMPLO 12.B.1

30

Efecto sobre los niveles de glucosa

Se realizó un experimento con otro grupo de polipéptidos mutantes FGF21 PEGilado. La Figura 11 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en la sangre de los ratones inyectados con vehículo (PBS), o las formas doblemente PEGilados de mutantes FGF21 que comprenden las mutaciones, es decir, E91/H125C, E91C/R175C, E37C/G120C, E37C/H125C, E37C/R175C; Fc-G170E FGF21 no PEGilado también se estudió. Se usaron moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa. Los resultados de este experimento confirman una vez más que los mutantes

35

76

FGF21 PEGilados doblemente muestran una farmacodinamia elevada en relación con la proteína de FGF21 de tipo salvaje.

Un experimento similar se realizó con otro grupo de polipéptidos mutantes FGF21 PEGilados. La Figura 12 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en la sangre de los ratones inyectados con vehículo (PBS), o las formas doblemente PEGiladas de mutantes FGF21 que comprenden las mutaciones, es decir, R77C PEGilado en N-terminal el cual se PEGiló también en el sitio de la polimerización introducido, R126K PEGilado en N-terminal el cual se PEGiló también en el sitio de la polimerización introducido, E91/G120C, G120C/H125C y E37C/R77C; Fc-G170E FGF21 no PEGilado también se estudió. Se usaron moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa. Los resultados de este experimento confirman que los mutantes FGF21 doblemente PEGilados demostraron farmacodinamia elevada en relación con la proteína FGF21 de tipo salvaje.

En otro experimento, la Figura 13 muestra el efecto de los mutantes FGF21 PEGilados en los niveles de glucosa en sangre de los ratones en el transcurso de un estudio de nueve días. Estos datos demuestran que las moléculas PEGiladas tienen una mayor potencia *in vivo* en comparación con la de la molécula nativa. En la Figura 13, los resultados se generaron con los mutantes FGF21 PEGilados E37C/R77C, E91C/R175C, E37C/H125C, E37C/R77C/P171G, E91C/R175C/P171G y E37C/H125C/P171G, las cuales se PEGilaron doblemente en el sitio introducido de unión al polímero. Los mutantes FGF21 se modificaron con dos moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en este estudio, y el vehículo usado fue fosfato de potasio 10 mM, 5% de sorbitol, pH 8.

Como se muestra en la Figura 13, las tres moléculas doble mutantes, doblemente PEGiladas E37C/R77C; E91C/R175C; E37C/H125C redujeron los niveles de glucosa en sangre, y los efectos se mantuvieron durante 72 horas después de una sola inyección. Curiosamente, la introducción de mutaciones P171G prolongó más las acciones *in vivo* y las máximas actividades reductoras de glucosa, se mantuvieron durante otros 2 días con duración total de la acción de 120 horas.

Además, la capacidad de reducción de la glucosa de varios polipéptidos FGF21 que comprenden tres mutaciones se estudiaron junto con varias moléculas ancladas. Los mutantes triples usados fueron E37C/R77C/P171G y E91C/H125C/P171G; las moléculas ancladas comprenden dos polipéptidos mutantes FGF21 idénticos que comprenden dos mutaciones, es decir, E37C/P171G y R77C/P171G. Moléculas maleimida metoxi PEG de 20 kDa se usaron para las formas doblemente PEGilados de FGF21, así como para la molécula del enlazador en la molécula anclada. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 14. En comparación con mutantes FGF21 anclados, los mutantes doblemente PEGilados tienen una farmacodinamia mejorada aún más. La actividad de

77

reducción de la glucosa de los mutantes doblemente PEGilados sostenida durante al menos 168 horas en comparación a 120 horas con mutantes FGF21 anclados.

La Figura 15 es un gráfico que muestra el cambio porcentual de la glucosa en sangre en función de la dosis en los ratones ob/ob inyectados con vehículo (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8.5) o diferentes dosis de un polipéptido mutante FGF21 doblemente PEGilado E37C/R77C/P171G en un período de nueve días. Los resultados de este experimento demuestran que el triple mutante doblemente PEGilado E37C/R77C/P171G redujo los niveles de glucosa en sangre en ratones ob/ob de forma dosis-dependiente. El nivel de dosis de 0.3mg/kg casi alcanzó la máxima actividad de reducción de los niveles de glucosa y los efectos se mantuvieron durante al menos 5 días. Aún mayor potencia *in vivo* y duración de la acción se observaron cuando el nivel de dosis se aumentó a 1 mg/kg.

EJEMPLO 12.B.2

Efecto sobre el peso corporal

La diabetes tipo 2 a menudo se acompaña con incremento de la adiposidad y el peso corporal. Una molécula terapéutica, por tanto, tendrá preferentemente el efecto deseable de reducir el peso corporal, así como el efecto deseable de reducir los niveles de glucosa en la sangre. En consecuencia, muchos de los mutantes FGF21 PEGilados que se describen en la presente se evaluaron por su efecto sobre el peso corporal en ratones.

Para estudiar el efecto de diversos polipéptidos mutantes FGF21 en el peso corporal, FGF21 de tipo salvaje PEGilado y polipéptidos mutantes se inyectaron por vía intraperitoneal a ratones de 8 semanas de edad *ob/ob* (Laboratorio Jackson), y el peso corporal se controló a varios tiempos después de una sola inyección, *por ejemplo*, 0, 24, 72, 120, y 168 horas después de la inyección.

La Figura 16 muestra el efecto de mutantes FGF21 PEGilado en el peso de los ratones durante el período de estudio. Los resultados se generaron mediante el uso de los polipéptidos mutantes FGF21 doblemente PEGilados E37C/R77C, E91C/R175C, E37C/H125C, E37C/R77C/P171G, E91C/R175C/P171G y E37C/H125C/P171G. Los mutantes FGF21 se modificaron con moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa en este estudio. Estos mutantes FGF21 se estudiaron también con respecto a los cambios en los niveles de glucosa y los resultados se muestran en la Figura 13. En conjunto, estos datos demuestran que los ratones que recibieron mutantes FGF21 PEGilados ganaron menos peso, en relación con el control de vehículo y que los polipéptidos mutantes FGF21 que comprenden la mutación resistente a la proteólisis P171G son más eficaces que sus contrapartes P171 de tipo salvaje.

La Figura 17 es un gráfico que muestra el cambio en el peso corporal de los ratones inyectados con el vehículo, o las formas doblemente PEGilados de un mutante

78

FGF21 que comprende las mutaciones, es decir, E37C/R77C/P171G; E91C/H125C/P171G; R77C/P171G y moléculas ancladas que comprende en un caso los dos polipéptidos mutantes E37C/P171G FGF21 y en otro caso, los dos polipéptidos mutantes R77C/P171G FGF21. Las moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa se usaron en las formas PEGilados de FGF21, mientras que el bis-maleimida PEG de 20 kDa se usó para las moléculas ancladas. Estos mutantes FGF21 se estudiaron también con respecto a los cambios en los niveles de glucosa y los resultados se muestran en la Figura 14. En conjunto, estos datos demuestran que los ratones que recibieron los mutantes FGF21 PEGilado ganaron menos peso, en relación con el control del vehículo. También se observó que los polipéptidos mutantes FGF21 doblemente PEGilado fueron más eficaces en la reducción de peso corporal que las moléculas ancladas estudiadas.

El efecto de un polipéptido mutante FGF21 doblemente PEGilado sobre el peso corporal también se examinó en un estudio de dosis múltiples. La Figura 18 es un gráfico que muestra el cambio en el peso corporal en función de la dosis en los ratones ob/ob inyectados con vehículo o diferentes dosis del doblemente PEGilado E37C/R77C/P171G durante un período de nueve días. Esta mutante de FGF21 se estudió también con respecto a los cambios en los niveles de glucosa y los resultados se muestran en la Figura 15. En conjunto, estos datos demuestran que una dosis de 0.3 mg/kg es suficiente para reducir la ganancia de peso corporal en ratones ob/ob después de una sola inyección.

20

Ejemplo 13

Estudio de vacuola renal murina

Una consideración para el empleo de PEG y otros polímeros para extender la vida media de una proteína terapéutica es la posibilidad de que la molécula PEGilada forme vacuolas en el riñón. Esta propiedad de PEG está bien documentada (*ver, por ejemplo*, Bendele, y otros, 1998, "Short Communication: Renal Tubular Vacuolation in Animals Treated with Polyethylene-glycol-conjugated Proteins," *Toxicological Sciences*, 42:152-157 y Conover y otros, 1996, "Transitional Vacuole Formation Following a Bolus Infusion of PEG-hemoglobin in the Rat," *Art. Cells. Blood Subs., and Immob. Biotech.* 24:599-611)) y puede ser impredecible. Una molécula PEGilada que induce la formación de vacuolas en el riñón normalmente, pero no necesariamente, hace que la molécula sea menos deseable como proteína terapéutica. En algunas circunstancias la vacuolización renal es de menor importancia y puede ser tolerada. Por consiguiente, se realizó un estudio a largo plazo de vacuolas en el riñón en ratones.

Los polipéptidos mutantes FGF21 se generaron como se describió en la presente. Un estudio se diseñó y llevado a cabo de la siguiente manera. Múltiples moléculas de FGF21 PEGilado se les administró una vez al día durante 7 días consecutivos a través de

67

la inyección subcutánea a ratones hembras C57BL/6 ratones (3/grupo) a una dosis de 10 mg/kg, un control del vehículo (KHPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8) y dos controles positivos se les administró de la misma manera. Se realizaron detalladas observaciones clínicas en todos los animales antes de cada administración de una dosis, y 1-2 horas después de la dosis en los días 1, 3 y 6; las observaciones al lado de las jaulas se recogieron 1-2 horas después de la dosis de todos los demás días de la administración. Los pesos corporales se recogieron antes de cada administración de una dosis y en la necropsia. Los riñones y el hígado se obtuvieron de todos los animales para la evaluación histológica. La Tabla 15 resume los resultados del estudio.

10

Tabla 15
Sumario del estudio de vacuolas en el riñón

Molécula	Riñón	Hígado
Vehículo	0.0	0.0
Control positivo	3.7	0.0
FGF21-1X-NT(PEG20K)	2.0	0.0
H126C 1X-PEG20K	2.3	0.0
R78C 1X-PEG20K	2.3	0.0
K70C 1X-PEG20K	2.0	0.0
G121C 1X-PEG20K	2.0	0.0
E38C 1X-PEG20K	2.0	0.0
R176C 1X-PEG20K	3.0	0.0
E92C 1X-PEG20K	2.7	0.0
N122C 1X-PEG20K	2.0	0.0
R127C 1X-PEG20K	3.0	0.0
G114C 1X-PEG20K	2.7	0.0
D80C 1X-PEG20K	2.0	0.0
D47C 1X-PEG20K	3.0	0.0
H112C 1X-PEG20K	2.6	0.0
K56R, K59R, K69R, K122R, R175K 2X-PEG20K	0.0	0.0
K56R, K59R, K69R, K122R, R77K 2X-PEG20K	0.0	0.0
K56R, K59R, K69R, K122R, R72K 2X-PEG20K	0.0	0.0

La Tabla 15 muestra los resultados de un estudio de vacuola murina de 7 días mediante el uso de vehículos (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,5), la forma N-terminal

68

PEGilada de FGF21 así como las formas PEGiladas de los mutantes FGF21 que comprenden las mutaciones H125C, R77C, K69C, G120C, E37C, R175, E91C, N121C, R126C, G113C, D79C, D46C y H112C. Una o dos moléculas de maleimida metoxi PEG de 20 kDa se usó, como se indicó en la tabla. Los índices de vacuola son un intervalo, siendo 0 ningún cambio observado en las vacuolas en relación con el control y siendo 4 la formación de vacuolas grave. Como se desprende de la Tabla 15, todos los mutantes FGF21 mono-PEGilados indujeron la formación de vacuolas de riñón. Sin embargo, ninguna de los dos mutantes FGF21 PEGilados indujo la formación de vacuolas. También se señaló que no se observó vacuolización en los hígados de los ratones.

Tras el estudio de una semana, un estudio crónico de 8 semanas se llevó a cabo. En este estudio, varias moléculas de FGF21 PEGiladas se les administró una vez por semana vía inyección subcutánea durante 8 semanas a mujeres C57BL/6 ratones (5/grupo) a dosis de 5 ó 25 mg/kg, un control del vehículo (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8.5) se administró de la misma manera. Todos los animales se observaron para signos clínicos una vez al día antes de la administración y 1-2 horas después de la dosis en los días de dosificación; una vez al día en días de no administración. Los pesos corporales se recogieron antes de cada administración de una dosis a partir del día 1 y luego en el tercer día después de cada dosis, y en la necropsia. Los riñones, el hígado y el bazo se obtuvieron de todos los animales (sacrificio moribundo y la eutanasia final) para su evaluación histológica.

Las Figuras 19A-19F es una serie de gráficos que muestran los resultados de cambio de peso observados durante el estudio de ocho semanas en vacuola renal mediante el empleo de un vehículo (cuadrados) y dos dosis de los mutantes FGF21 doblemente PEGilados, es decir, 5 mg/kg (triángulos) y 25 mg/kg (círculos abiertos). Los mutantes FGF21 estudiadas incluyen R77C, P171G (Figura 19A); E37C, R77C, P171G (Figura 19B); E37C, H125C, P171G (Figura 19C); E91C, H125C, P171G (Figura 19D); E37C, P171G (Figura 19E) y R77C, P171G (Figura 19F). En la Figura 19A, un enfoque de química mixta se empleó, lo que guió a la PEGilación N-terminal del mutante de FGF21, así como PEGilación en el sitio de unión al polímero introducido, la cisteína no natural en 77. En las Figuras 19B, 19D, un enfoque de la química individual se empleó, lo que guió a la PEGilación en los sitios introducidos de unión al polímero, los residuos de cisteína no naturales (cisteínas en las posiciones 37 y 77 en la figura 19B, las posiciones 37 y 125 en la Figura 19C, y posiciones 91 y 125 en la figura 19D). Por último, en las Figuras 19D y 19E, un solo bis-maleimida PEG se usó para unir dos mutantes FGF21, junto a los residuos de cisteína no naturales (cisteína en la posición 37 en la Figura 21E y la posición 77 en la Figura 19F).

La Figura 20 comprende dos gráficos de barras que muestran la puntuación media de vacuolas renales observadas durante el estudio de de vacuolas renales por ocho semanas para dos dosis, 5 y 25 mg/kg, de seis mutantes FGF21 individuales o doblemente PEGilados. Una puntuación de 0 indica que no se observaron más vacuolas que las encontradas en los animales control, mientras que una puntuación de 4 indica la formación de vacuolas graves en relación con el control. Los mutantes FGF21 fueron los mismos que los descritos en la Figura 19A-19E. Así, para un constructo se empleó un enfoque de química mixta, lo que guió a PEGilación N-terminal del mutante de FGF21, así como PEGilación en el sitio introducido de unión al polímero, la cisteína no natural en 77. Un enfoque de química individual se empleó para otras tres construcciones, lo que guió a PEGilación en los sitios introducidos de unión al polímero, los residuos de cisteína no naturales (cisteínas en las posiciones 37 y 77 en una construcción, las posiciones 37 y 125 en una segunda construcción o las posiciones 91 y 125 en la tercera construcción). Por último, un único bis-maleimida PEG se usó para unir dos mutantes FGF21, a los residuos de cisteína no naturales (cisteína en la posición 37, o la posición 77). La mutación P171G se introdujo en cada una de las seis construcciones.

Mientras que la invención se describió en términos de varias realizaciones, se entiende que se producirán las variaciones y modificaciones por aquellos con experiencia en la materia. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones anexas abarquen todas las modificaciones equivalentes están dentro del alcance de la invención reivindicada. Además, los títulos de las secciones que se usaron en la presente son para fines de organización solamente y no debe interpretarse como limitación de la materia descrita.

Todas las referencias citadas en esta descripción están expresamente incorporadas como referencia en la presente invención.

82

REIVINDICACIONES:

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de sec. con núm. de ident.: 4 que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es:

- 5 (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175;
 (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179;
 (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122;
 (d) un residuo de glicina en la posición 170;
 10 (e) un residuo de glicina en la posición 171;
 y combinaciones de (a) – (e).

2. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la Reivindicación 1.

15

3. Una célula huésped que comprende el vector de la Reivindicación 2.

4. La célula huésped de la Reivindicación 3 que es una célula eucariota.

20

5. La célula huésped de la Reivindicación 3 que es una célula procariota.

6. Un proceso de producir un polipéptido codificado por el vector de la Reivindicación 2 que comprende cultivar una célula huésped que comprende el vector de la Reivindicación 2 bajo condiciones adecuadas para expresar el polipéptido, y
 25 opcionalmente aislar el polipéptido.

7. Un polipéptido producido por el proceso de la Reivindicación 6.

8. El polipéptido de la Reivindicación 7, que comprende, además, un residuo
 30 de prolina o glicina añadido al C-terminal del polipéptido.

9. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es:

- 35 (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175;
 (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179;
 (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122;

46

- (d) un residuo de glicina en la posición 170;
- (e) un residuo de glicina en la posición 171;
- y combinaciones de (a) – (e),

- 5 10. El polipéptido de la Reivindicación 9, que comprende, además, un residuo de prolina o glicina añadido al C-terminal del polipéptido.
11. El polipéptido aislado de la Reivindicación 9, en donde el polipéptido está covalentemente unido a uno o más polímeros.
- 10 12. El polipéptido aislado de la Reivindicación 11, en donde el polipéptido está covalentemente unido a un polímero.
13. El polipéptido aislado de la Reivindicación 12, en donde el polímero es un
- 15 polímero soluble en agua.
14. El polipéptido aislado de la Reivindicación 13, en donde el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímero de propilenglicol,
- 20 copolímeros de óxido de polipropileno /óxido de etileno, polioles polioxietilados, o alcohol polivinílico.
15. El polipéptido aislado de la Reivindicación 14, en donde el polímero soluble en agua es PEG.
- 25 16. El polipéptido aislado de la Reivindicación 11, en donde el polímero es un polímero ramificado.
17. El polipéptido aislado de la Reivindicación 9, en donde el polipéptido tiene
- 30 una porción PEG covalentemente unida a su amino-terminal.
18. El polipéptido aislado de la Reivindicación 9, en donde el polipéptido está covalentemente unido a dos polímeros.
- 35 19. El polipéptido aislado de la Reivindicación 18, en donde uno de los dos polímeros es un polímero soluble en agua.

20. El polipéptido aislado de la Reivindicación 19, en donde el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímero de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno /óxido de etileno, polioles polioxietilados, o alcohol polivinílico.

21. El polipéptido aislado de la Reivindicación 20, en donde el polímero soluble en agua es PEG.

22. El polipéptido aislado de la Reivindicación 18, en donde uno de los polímeros es ramificado.

23. El polipéptido aislado de la Reivindicación 18, en donde los dos polímeros son ramificados.

24. El polipéptido aislado de la Reivindicación 9, en donde el polipéptido tiene una porción PEG covalentemente unida a su amino-terminal.

25. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado de la Reivindicación 9 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.

26. La composición farmacéutica de la Reivindicación 25, en donde el agente de formulación farmacéuticamente aceptable es un portador, adyuvante, solubilizador, estabilizante, o anti-oxidante.

27. Un método para tratar un trastorno metabólico que comprende administrar a un paciente humano necesitado del mismola composición farmacéutica de la Reivindicación 26.

28. El método de la Reivindicación 27, en donde el trastorno metabólico es diabetes.

29. El método de la Reivindicación 27, en donde el trastorno metabólico es obesidad.

25

30. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es:

- (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175;
- 5 (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179;
- (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122;
- (d) un residuo de glicina en la posición 170;
- (e) un residuo de glicina en la posición 171;
- 10 y combinaciones de (a) – (e),

y que comprende adiciones, deleciones o sustituciones adicionales que hacen el polipéptido al menos 85% idéntico a la sec. con núm. de ident.:4, siempre que la al menos una sustitución de aminoácidos de la Reivindicación 1(a) – (e) no sea modificada adicionalmente.

15

31. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la Reivindicación 30.

32. Una célula huésped que comprende el vector de la Reivindicación 31.

20

33. La célula huésped de la Reivindicación 32 que es una célula eucariota.

34. La célula huésped de la Reivindicación 32 que es una célula procariota.

25

35. Un proceso de producir un polipéptido codificado por el vector de la Reivindicación 30 que comprende cultivar una célula huésped que comprende el vector de la Reivindicación 30 bajo condiciones adecuadas para expresar el polipéptido, y opcionalmente aislar el polipéptido.

30

36. Un polipéptido producido por el proceso de la Reivindicación 35.

37. El polipéptido de la Reivindicación 36, que comprende, además, un residuo de prolina o glicina añadido al C-terminal del polipéptido.

35

38. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es:

- (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175;

40

- (b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179;
- (c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122;
- (d) un residuo de glicina en la posición 170;
- 5 (e) un residuo de glicina en la posición 171;
- y combinaciones de (a) – (e),

y que comprende adiciones, delecciones o sustituciones adicionales que hacen el polipéptido al menos 85% idéntico a la sec. con núm. de ident.:4, siempre que la al menos una sustitución de aminoácidos de la Reivindicación 1(a) – (e) no sea modificada

10 adicionalmente.

39. El polipéptido de la Reivindicación 38, que comprende, además, un residuo de prolina o glicina añadido al C-terminal del polipéptido.

15 40. El polipéptido aislado de la Reivindicación 38, en donde el polipéptido está covalentemente unido a un polímero.

41. El polipéptido aislado de la Reivindicación 40, en donde el polímero es un polímero soluble en agua.

20

42. El polipéptido aislado de la Reivindicación 41, en donde el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímero de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno /óxido de etileno, polioles polioxietilados, o

25 alcohol polivinílico.

43. El polipéptido aislado de la Reivindicación 42, en donde el polímero soluble en agua es PEG.

30 44. El polipéptido aislado de la Reivindicación 40, en donde el polímero es ramificado.

45. El polipéptido aislado de la Reivindicación 38, en donde el polipéptido tiene una porción PEG sencilla covalentemente unida a su amino-terminal.

35

46. El polipéptido aislado de la Reivindicación 38, en donde el polipéptido está covalentemente unido a dos polímeros.

47

47. El polipéptido aislado de la Reivindicación 46, en donde uno de los dos polímeros es un polímero soluble en agua.

5 48. El polipéptido aislado de la Reivindicación 47, en donde el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli--(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímero de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno /óxido de etileno, polioles polioxietilados, o alcohol polivinílico.

10

49. El polipéptido aislado de la Reivindicación 48, en donde el polímero soluble en agua es PEG.

15

50. El polipéptido aislado de la Reivindicación 46, en donde los dos polímeros son polímeros solubles en agua.

20

51. El polipéptido aislado de la Reivindicación 50, en donde los polímeros solubles en agua son independientemente polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli--(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno /óxido de etileno, polioles polioxietilados, o alcohol polivinílico y combinaciones de los mismos.

25

52. El polipéptido aislado de la Reivindicación 46, en donde los dos polímeros solubles en agua son PEG.

30

53. El polipéptido aislado de la Reivindicación 46, en donde uno de los polímeros es ramificado.

54. El polipéptido aislado de la Reivindicación 46, en donde los dos polímeros son ramificados.

55. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado de la Reivindicación 38 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.

35

56. La composición farmacéutica de la Reivindicación 55, en donde el agente de formulación farmacéuticamente aceptable es un portador, adyuvante, solubilizador, estabilizante, o anti-oxidante.

48

57. Un método para tratar un trastorno metabólico que comprende administrar a un paciente humano necesitado del mismola composición farmacéutica de la Reivindicación 56.

5

58. El método de la Reivindicación 57, en donde el trastorno metabólico es diabetes.

59. El método de la Reivindicación 57, en donde el trastorno metabólico es
10 obesidad.

60. Una composición que comprende un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 opcionalmente que tiene al menos una sustitución de aminoácidos que es:

- 15 (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175;
(b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179;
(c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122;
(d) un residuo de glicina en la posición 170;
20 (e) un residuo de glicina en la posición 171;
y combinaciones de (a) – (e),

unidos por un enlazador a un segundo polipéptido que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4 opcionalmente con al menos una sustitución de aminoácidos que es:

- 25 (a) un residuo de lisina en una o más de las posiciones 36, 72, 77, 126 y 175;
(b) un residuo de cisteína en una o más de las posiciones 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170, y 179;
(c) un residuo de arginina en una o más de las posiciones 56, 59, 69, y 122;
(d) un residuo de glicina en la posición 170;
30 (e) un residuo de glicina en la posición 171;
y combinaciones de (a) – (e).

61. El polipéptido de la Reivindicación 60, en donde el primer, segundo o ambos polipéptidos comprenden, además, un residuo de prolina o glicina añadido al C-terminal del polipéptido.
35

4^a

62. La composición de la Reivindicación 60, en donde el enlazador es un péptido.

5 63. La composición de la Reivindicación 60, en donde el enlazador es un polímero insoluble en agua.

64. La composición de la Reivindicación 63, en donde el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de 10 óxido de polipropileno /óxido de etileno, polioles polioxietilados, o alcohol polivinílico.

65. La composición de la Reivindicación 64, en donde el polímero soluble en agua es PEG.

15 66. La composición de la Reivindicación 60, en donde el primer, segundo o los dos polipéptidos están covalentemente unidos, además, a un polímero, además del enlazador.

20 67. La composición de la Reivindicación 66, en donde el polímero es un polímero soluble en agua.

25 68. La composición de la Reivindicación 67, en donde el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno /óxido de etileno, polioles polioxietilados, o alcohol polivinílico.

69. La composición de la Reivindicación 68, en donde el polímero soluble en agua es PEG.

30 70. La composición de la Reivindicación 63, en donde el polímero es ramificado.

71. La composición de la Reivindicación 60, en donde la composición tiene una porción PEG sencilla covalentemente unida a su amino-terminal.

35

72. La composición de la Reivindicación 60, en donde la composición está covalentemente unida a dos polímeros.

90

73. La composición de la Reivindicación 72, en donde uno de los dos polímeros es un polímero soluble en agua.

5 74. La composición de la Reivindicación 73, en donde el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno /óxido de etileno, polioles polioxietilados, o alcohol polivinílico.

10 75. La composición de la Reivindicación 74, en donde el polímero soluble en agua es PEG.

76. La composición de la Reivindicación 72, en donde los dos polímeros son polímeros solubles en agua.

15

77. La composición de la Reivindicación 76, en donde los polímeros solubles en agua son independientemente polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno /óxido de etileno, polioles polioxietilados, o alcohol polivinílico y combinaciones de los mismos.

20

78. La composición de la Reivindicación 77, en donde los dos polímeros solubles en agua son PEG.

25 79. El polipéptido aislado de la Reivindicación 72, en donde uno de los polímeros es ramificado.

80. El polipéptido aislado de 72 en donde los dos polímeros son ramificados.

30 81. Una composición farmacéutica que comprende la composición de la Reivindicación 60 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.

82. La composición farmacéutica de la Reivindicación 81, en donde el agente de formulación farmacéuticamente aceptable es un portador, adyuvante, solubilizador, estabilizante, o anti-oxidante.

35

a1

83. Un método para tratar un trastorno metabólico que comprende administrar a un paciente humano necesitado del mismo la composición farmacéutica de la Reivindicación 81.

5 84. El método de la Reivindicación 83 en donde el trastorno metabólico es diabetes.

85. El método de la Reivindicación 83, en donde el trastorno metabólico es obesidad.

10

92

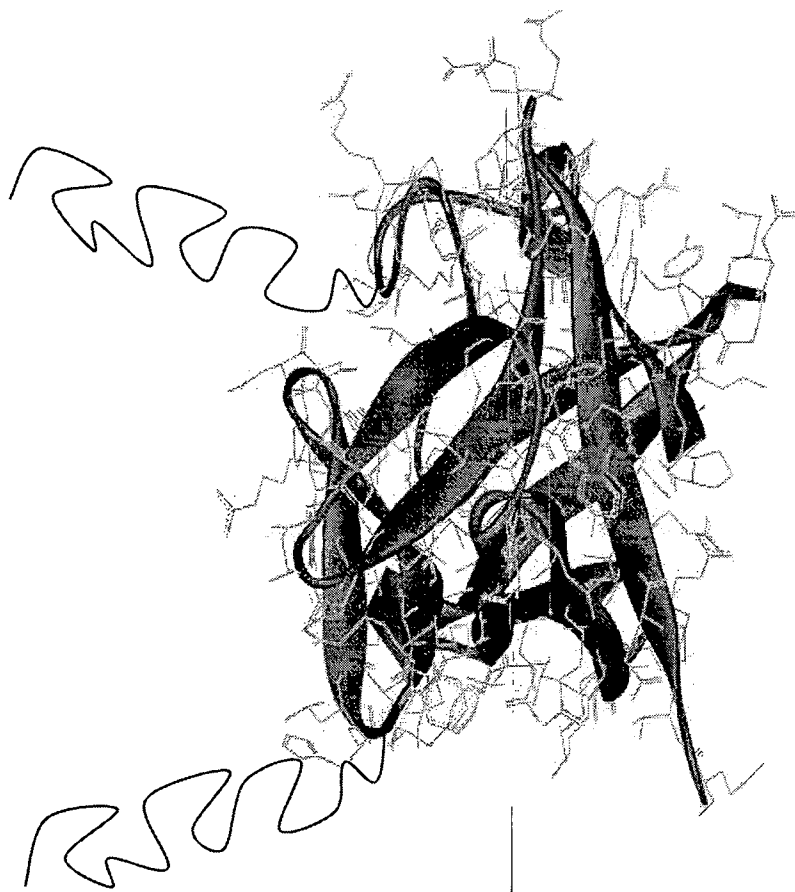
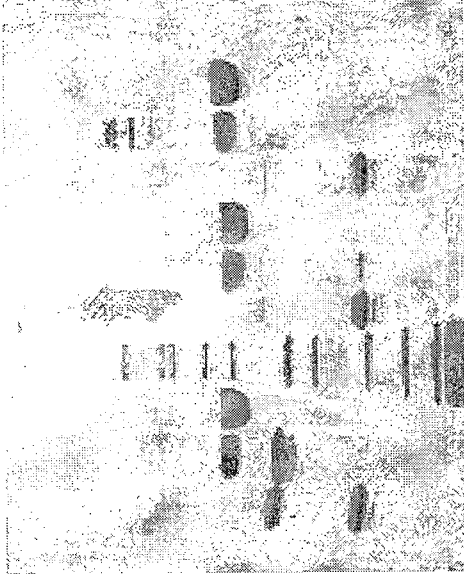


Figura 1

E37C R77C H125C



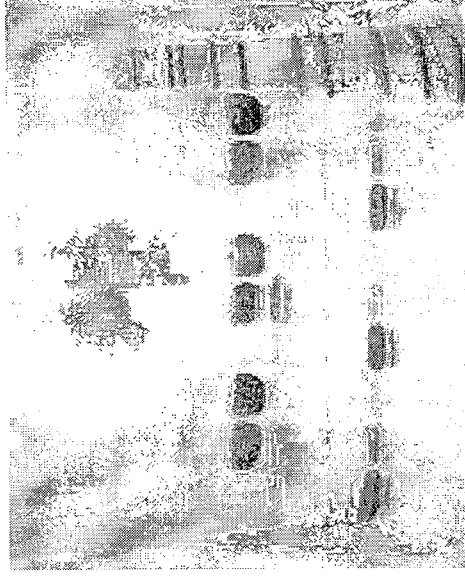
D38C D46C D79C



H87C E91C G113C



G120C R126C N121C



94

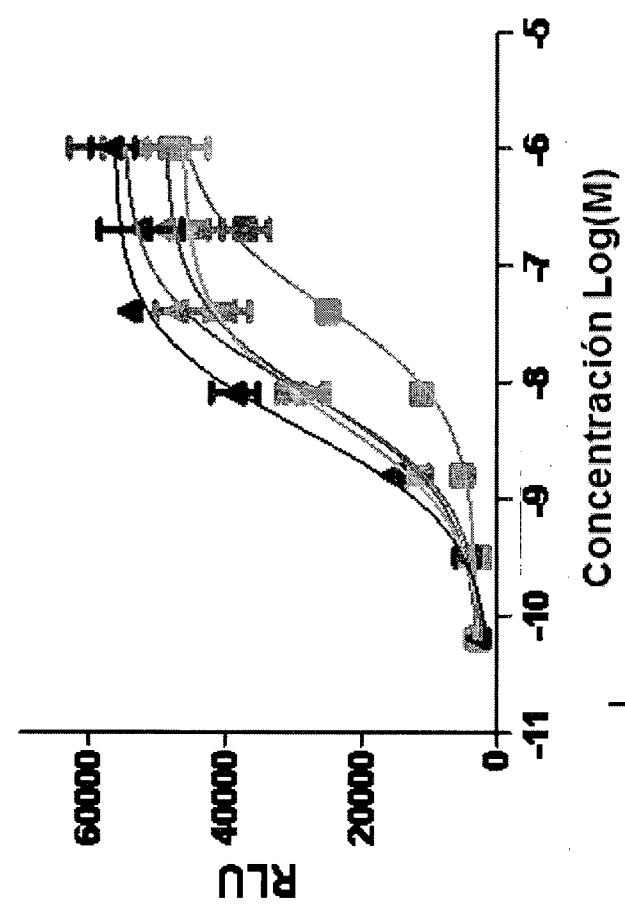
Figura 2

K69C R175C Y179C



Figura 3

▲ WT
 ■ WT-NPEG
 ● E37C-PEG
 ■ R77C-PEG
 ▲ E91C-PEG



▲ WT
 ■ WT-NPEG
 ▼ G113C-PEG
 ◆ N121C-PEG
 ▼ D46C-PEG

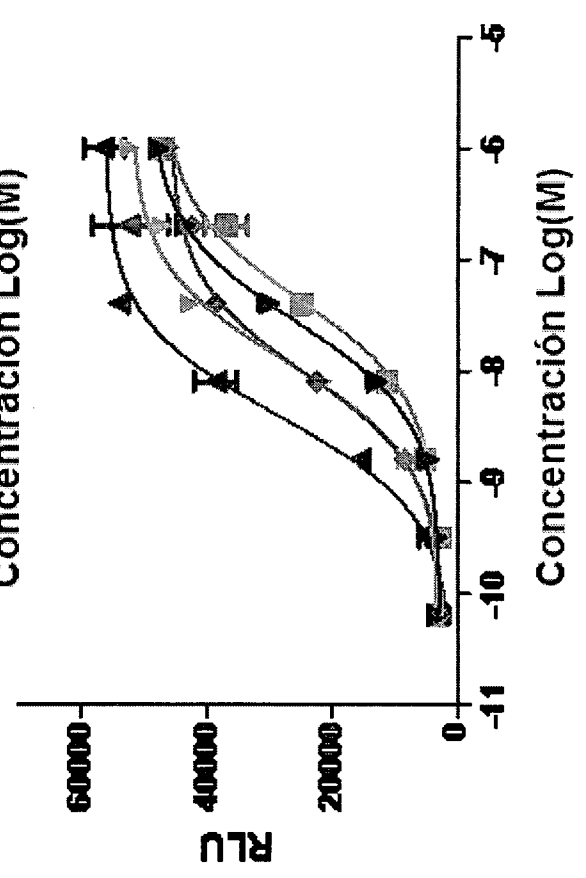


Figura 4

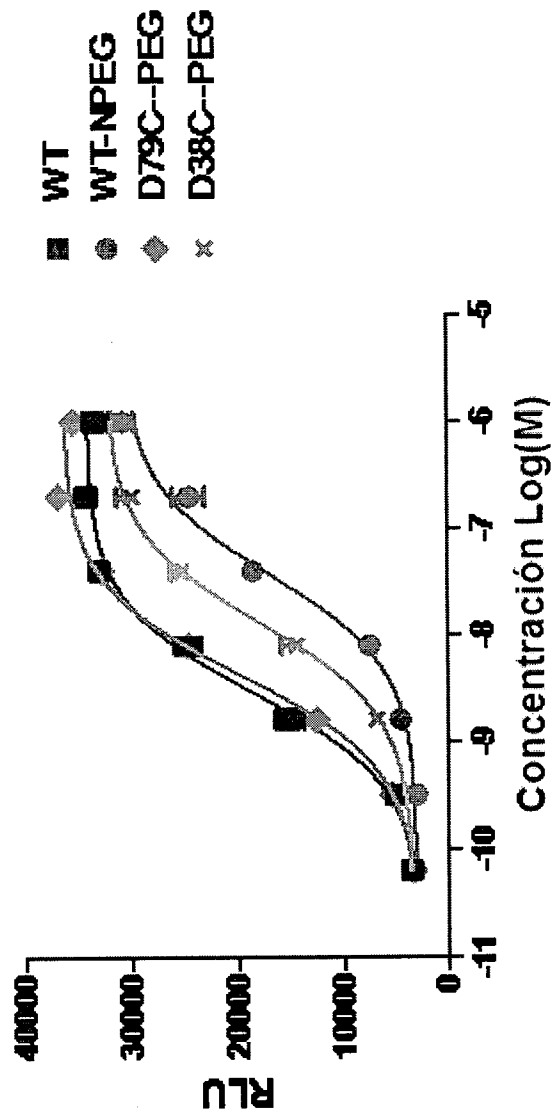
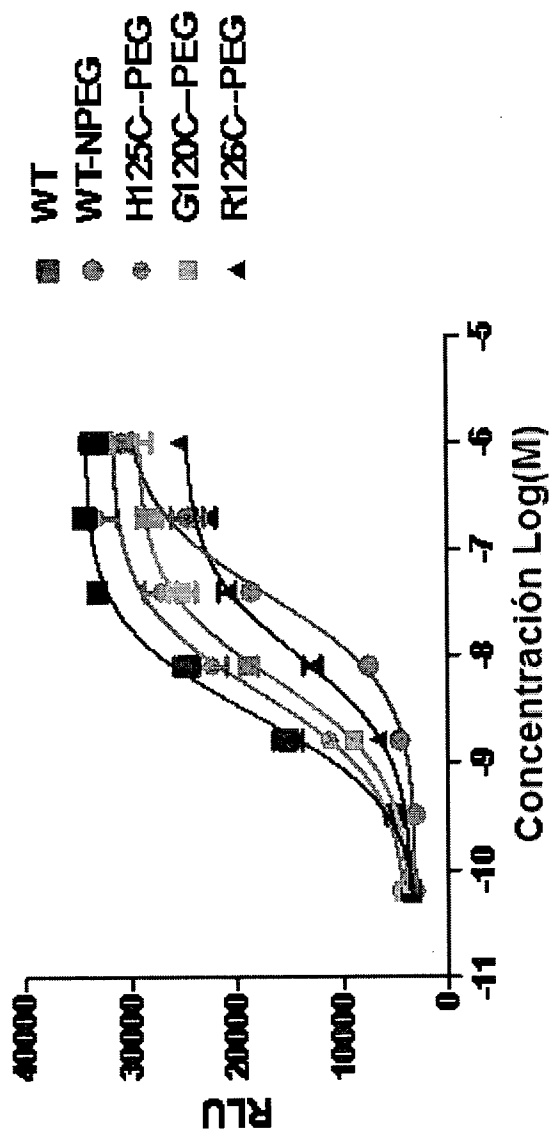


Figura 5

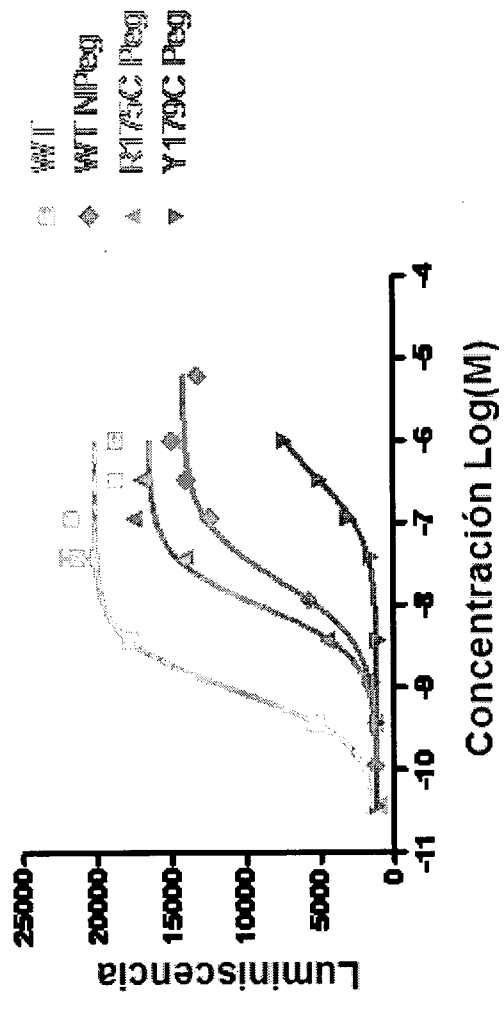
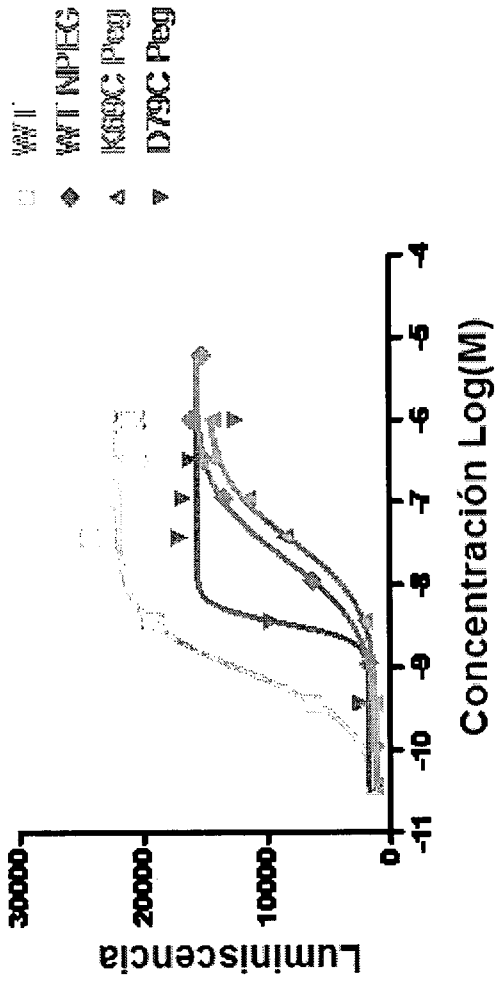


Figura 6

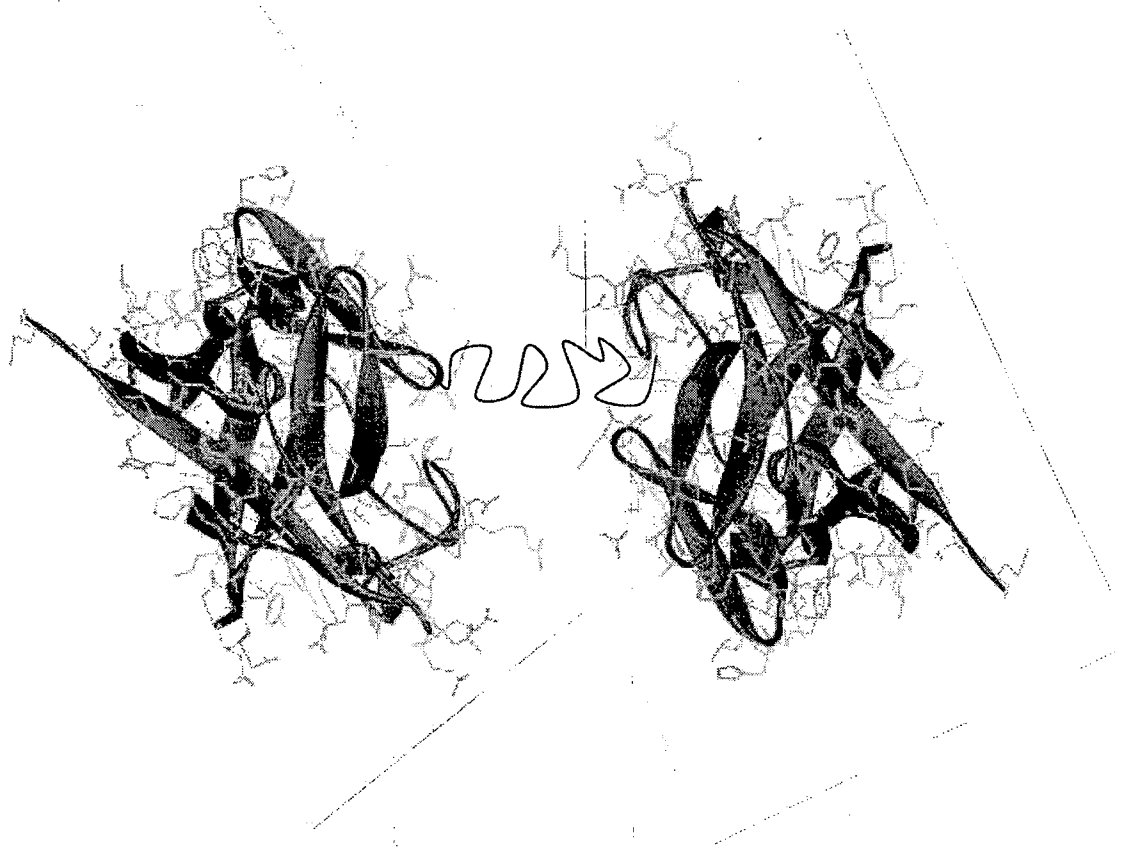


Figura 7

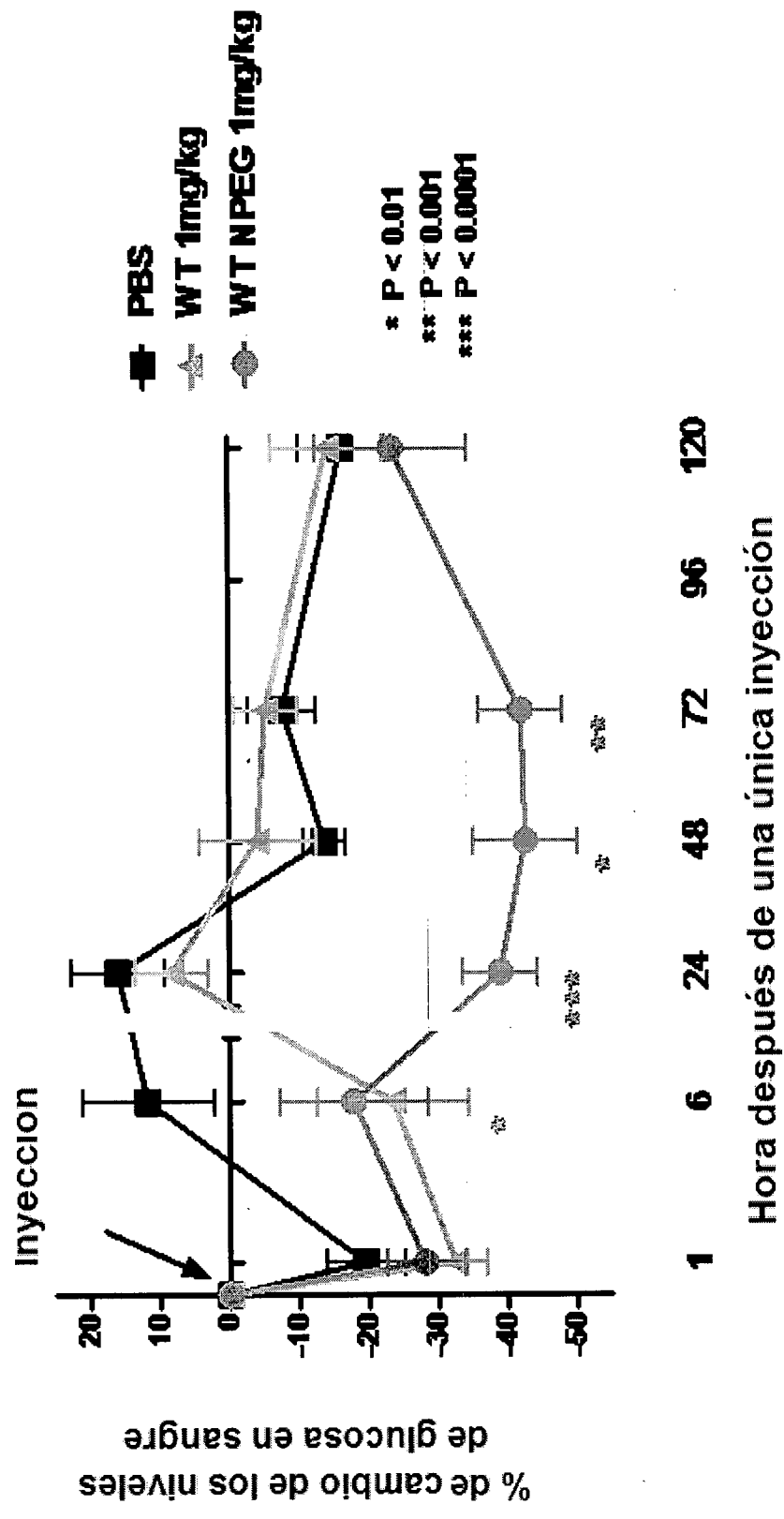


Figura 8

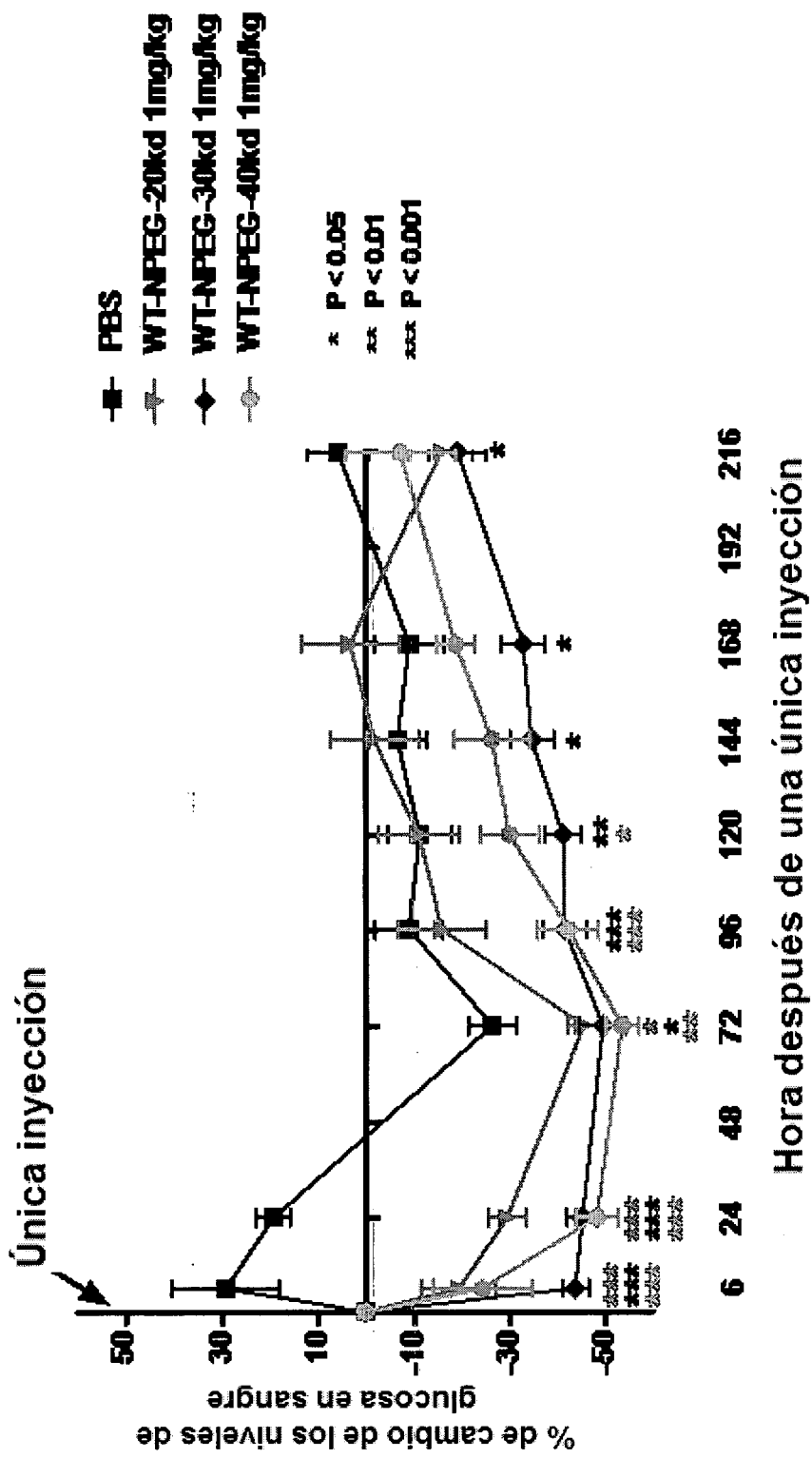


Figura 9

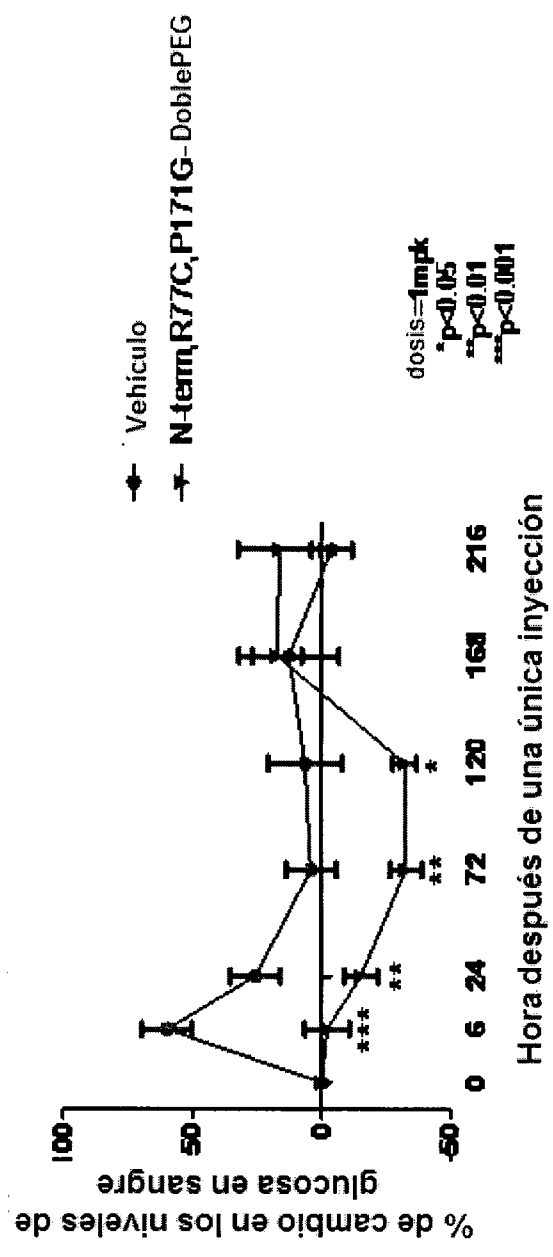
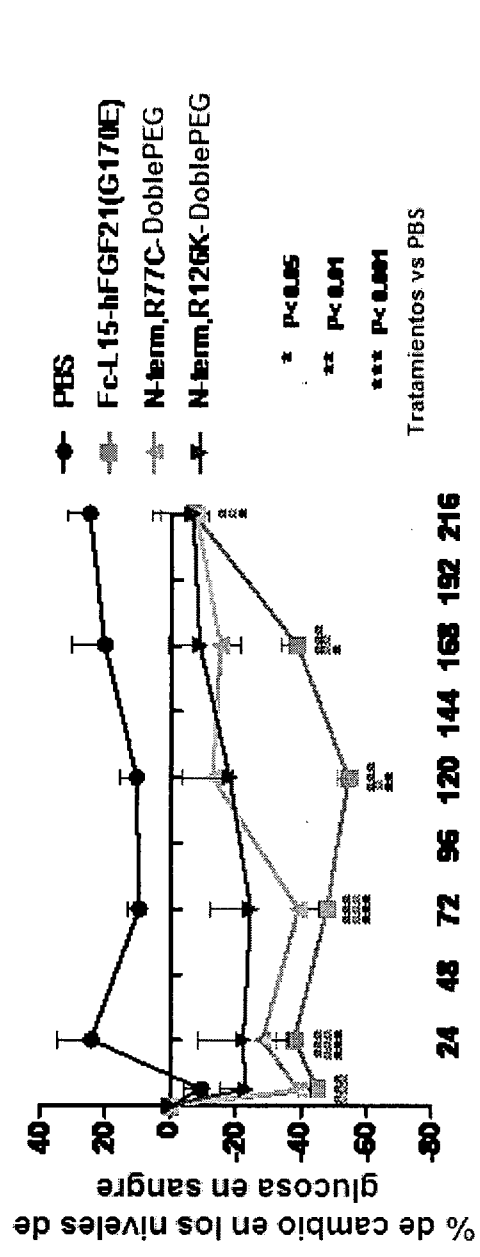


Figura 10

102

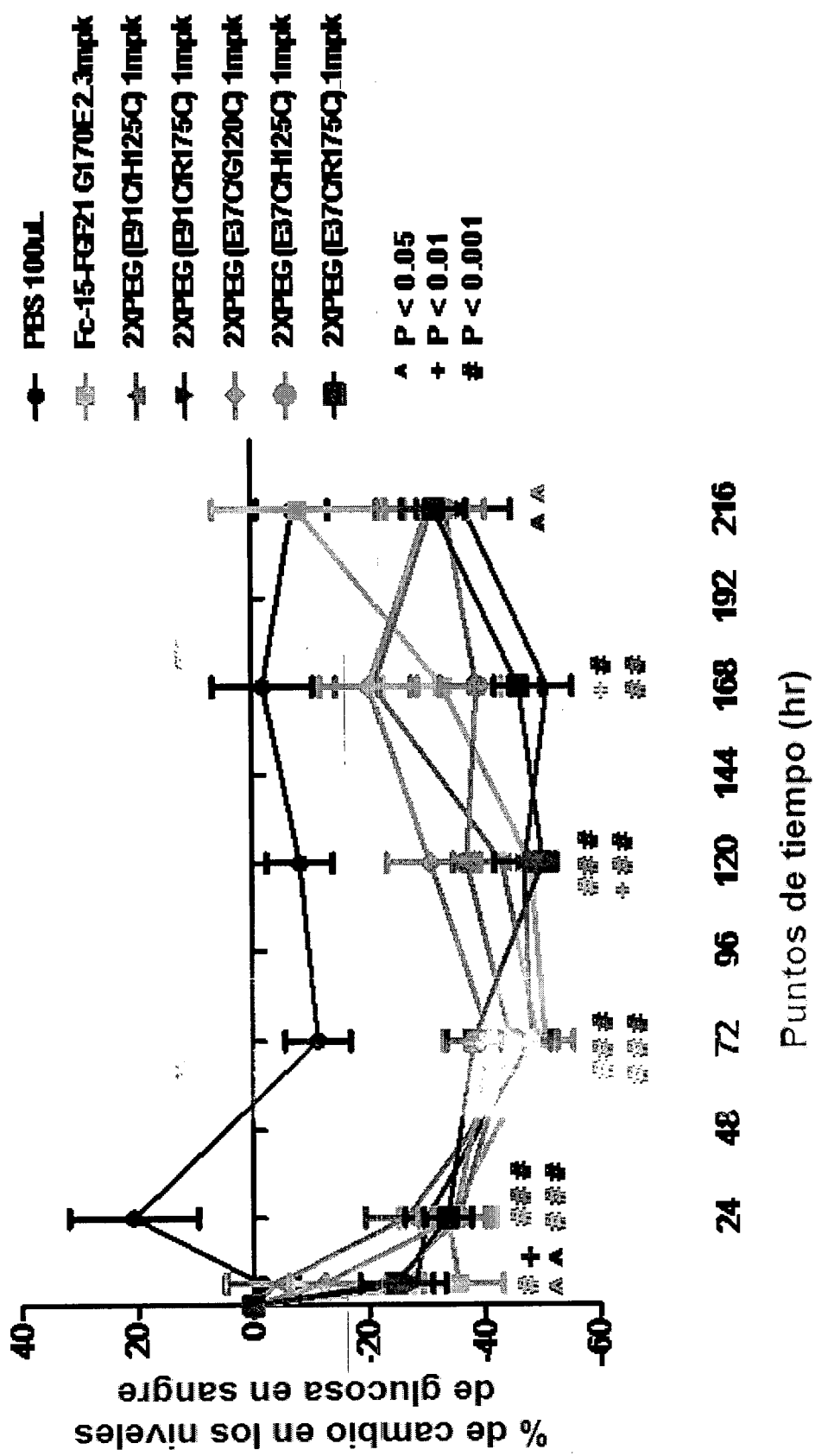


Figura11

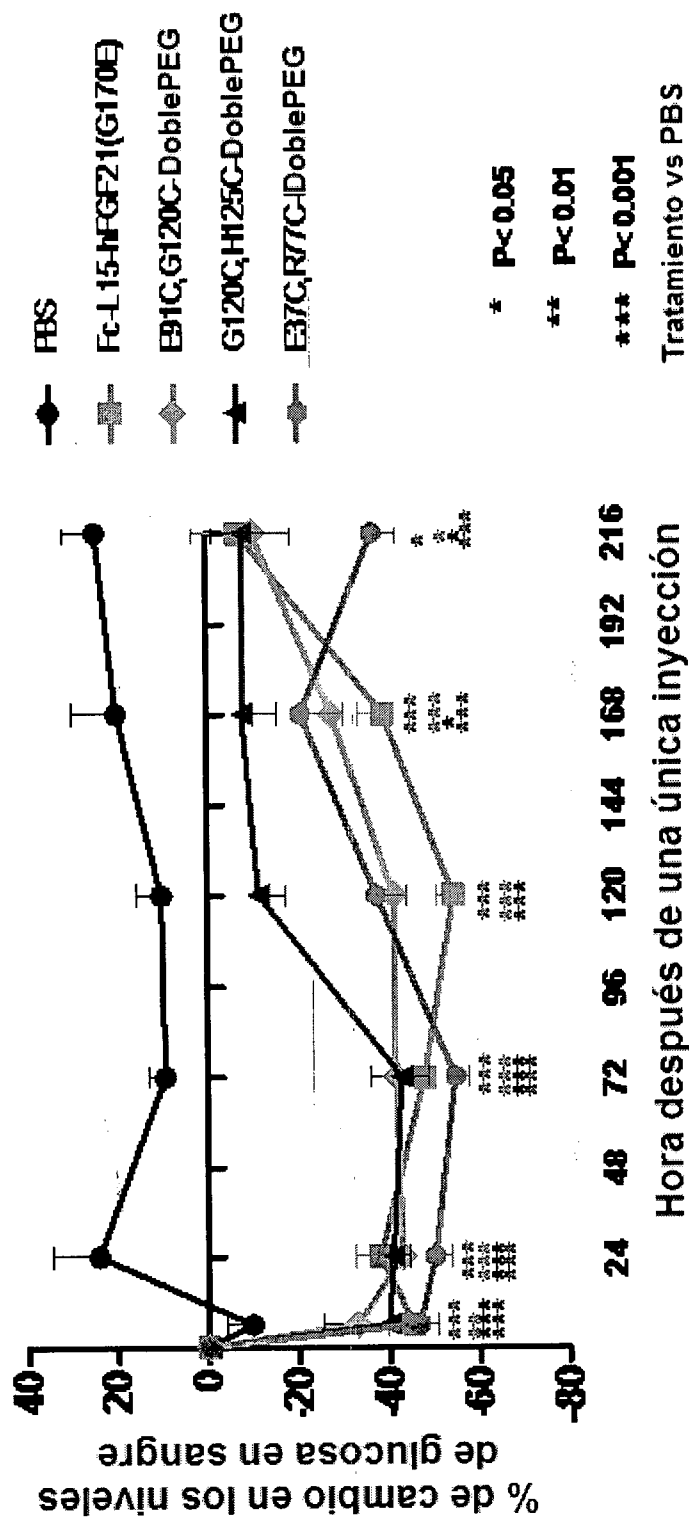


Figura 12

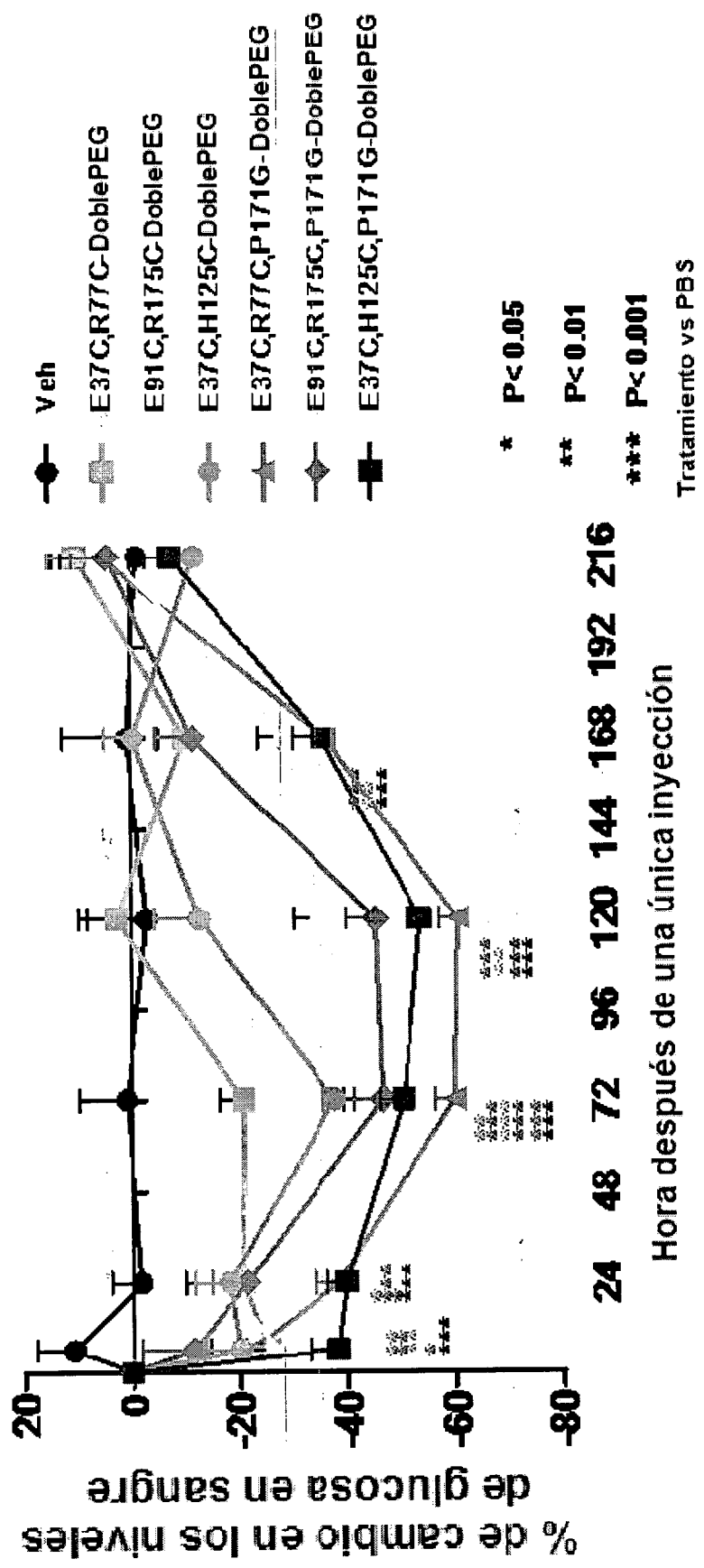


Figura 13

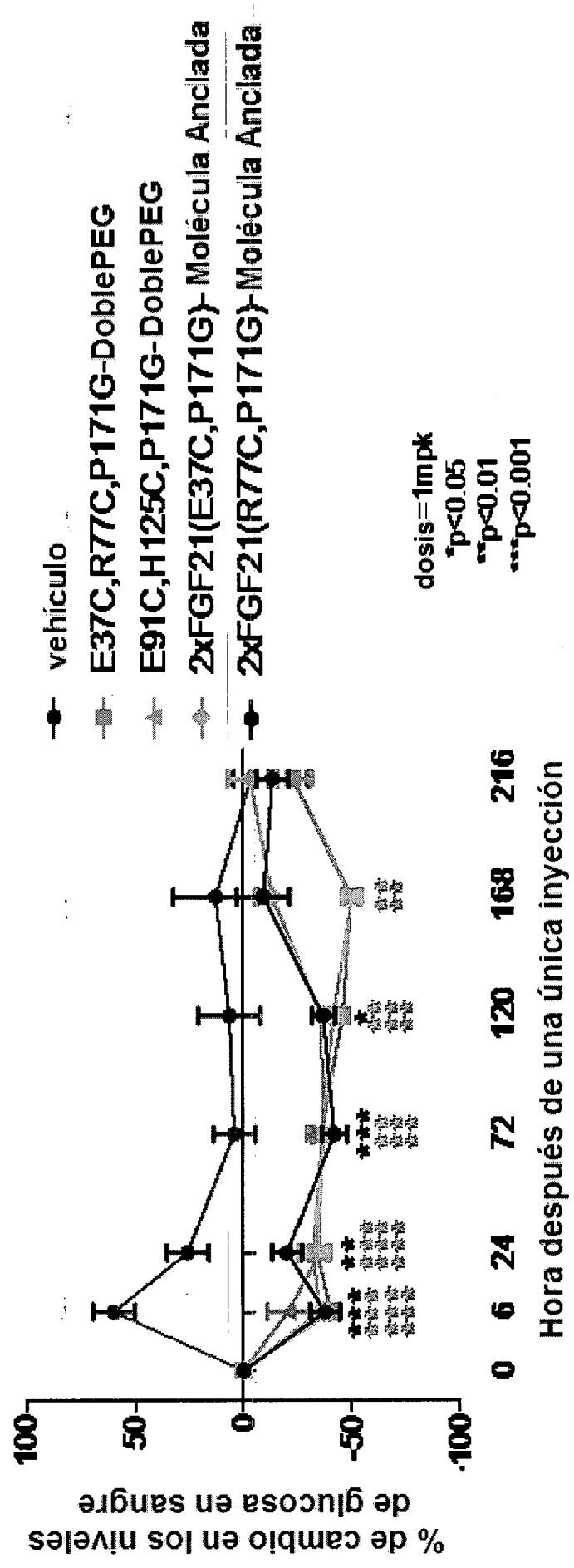


Figura 14

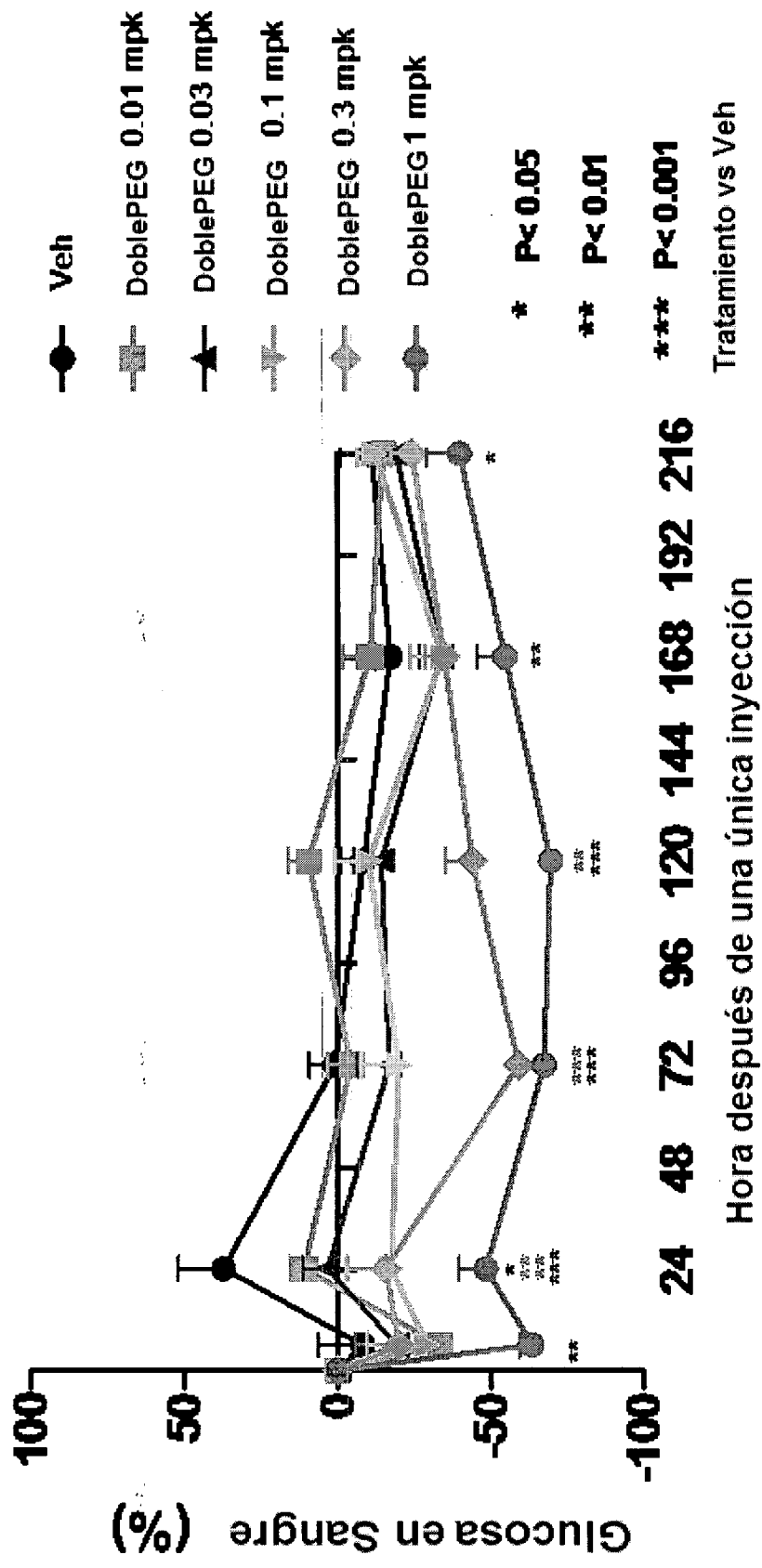


Figura 15

102

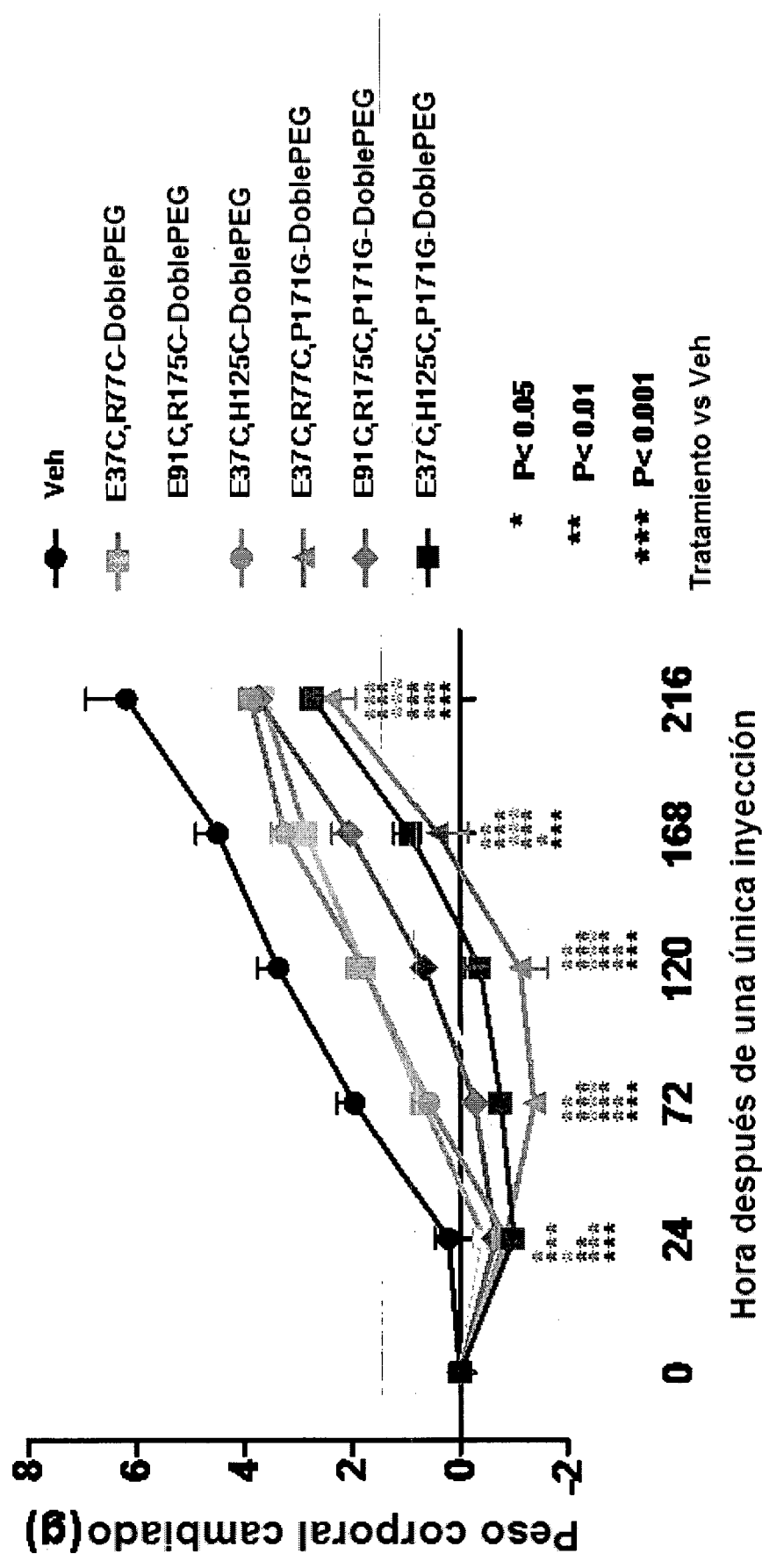


Figura16

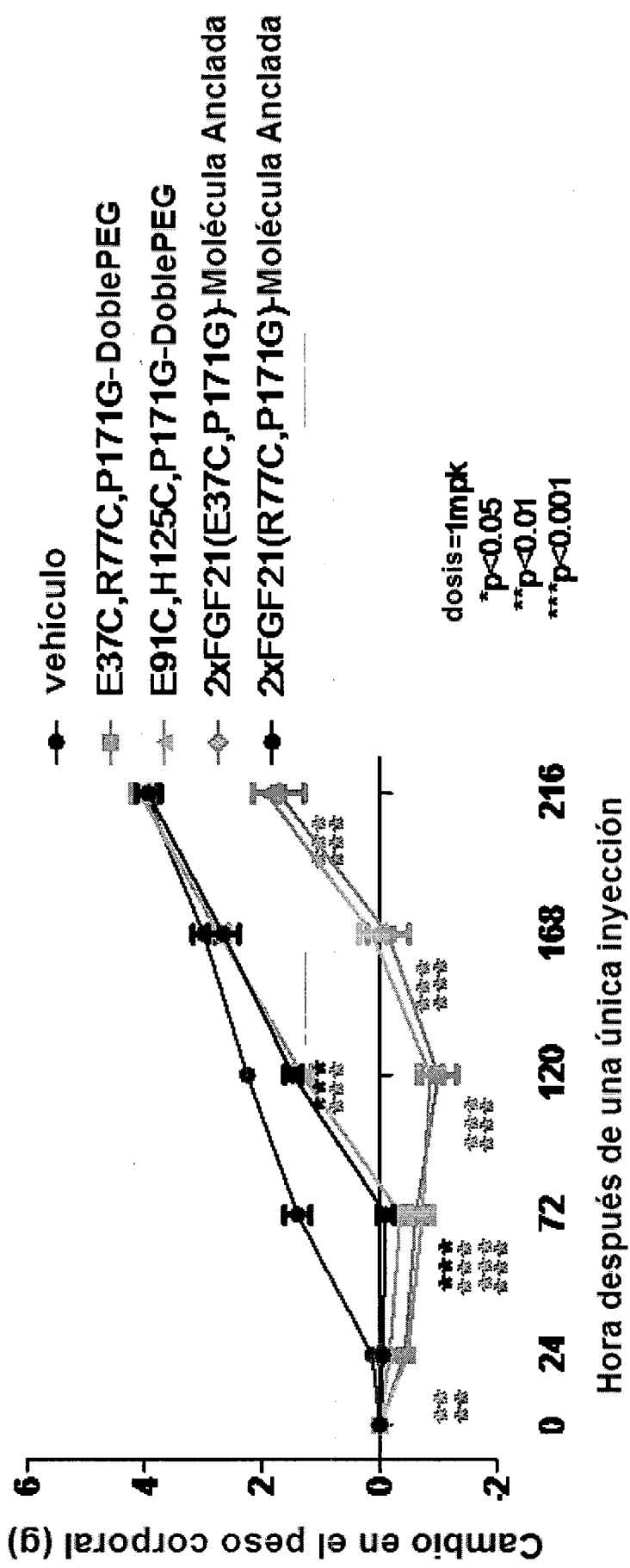


Figura 17

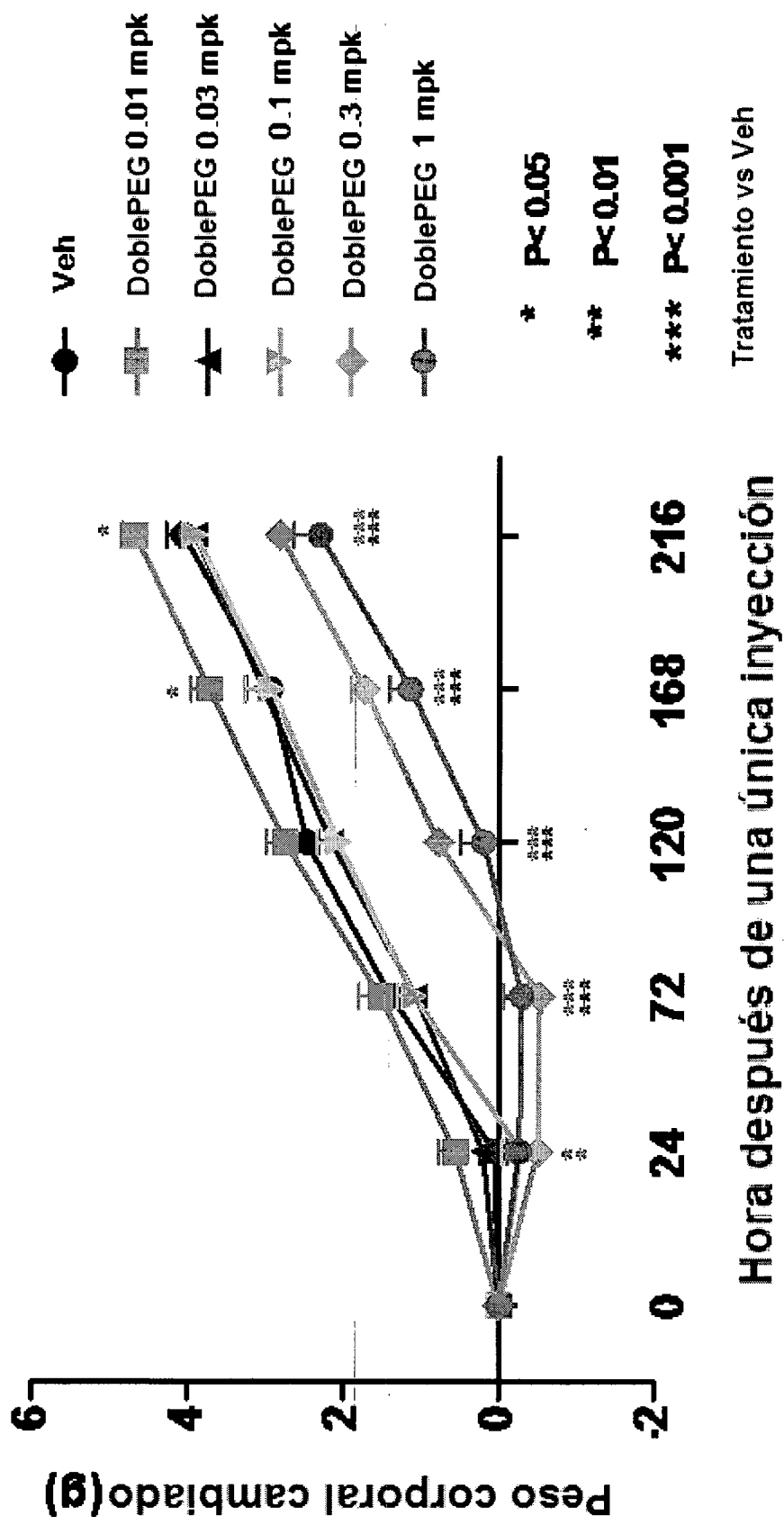


Figura 18

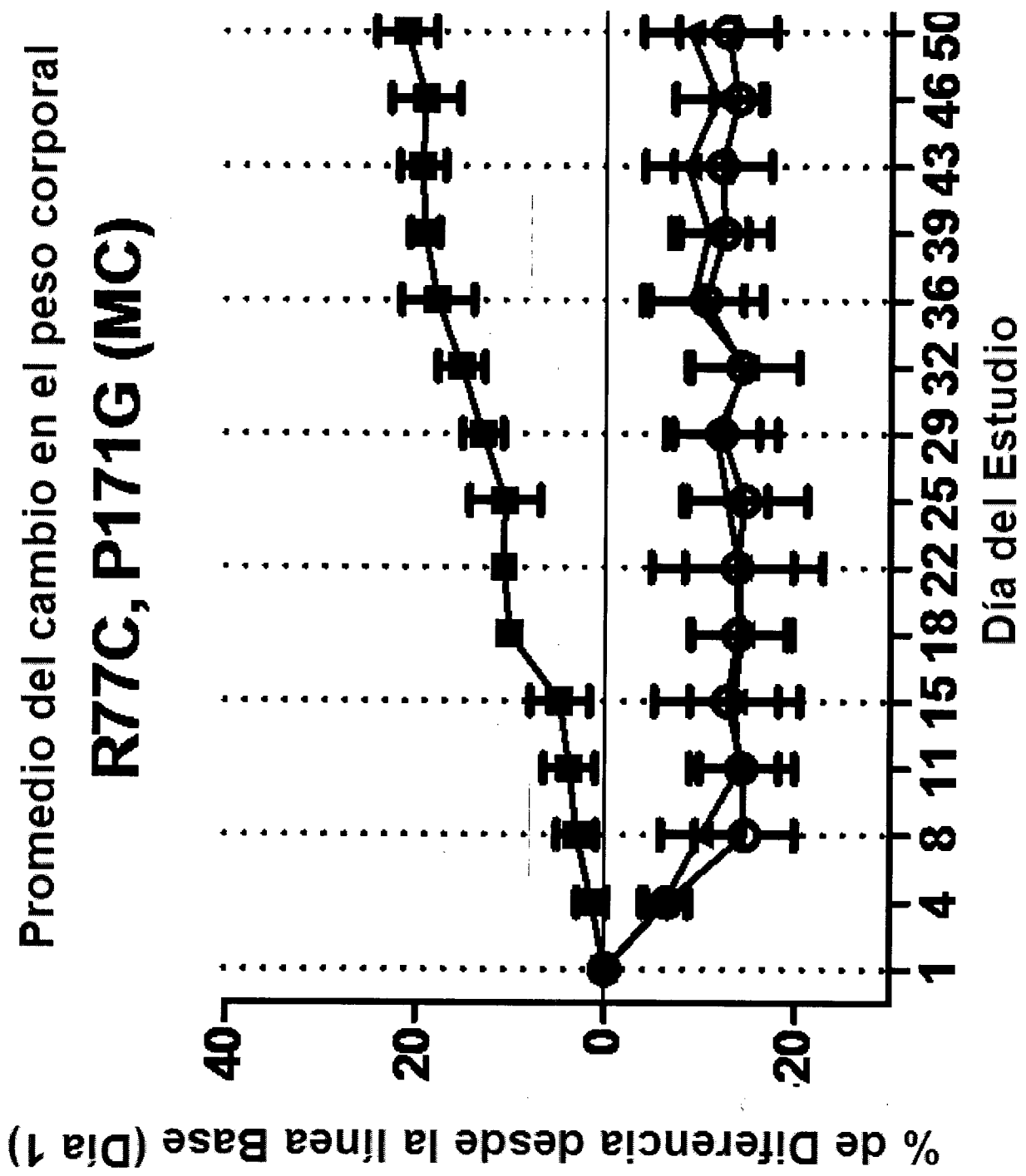


Figura 19A

111

% de Diferencia desde la línea Base (Día 1)

Promedio del cambio en el peso corporal
E37C, R77C, P171G (SC)

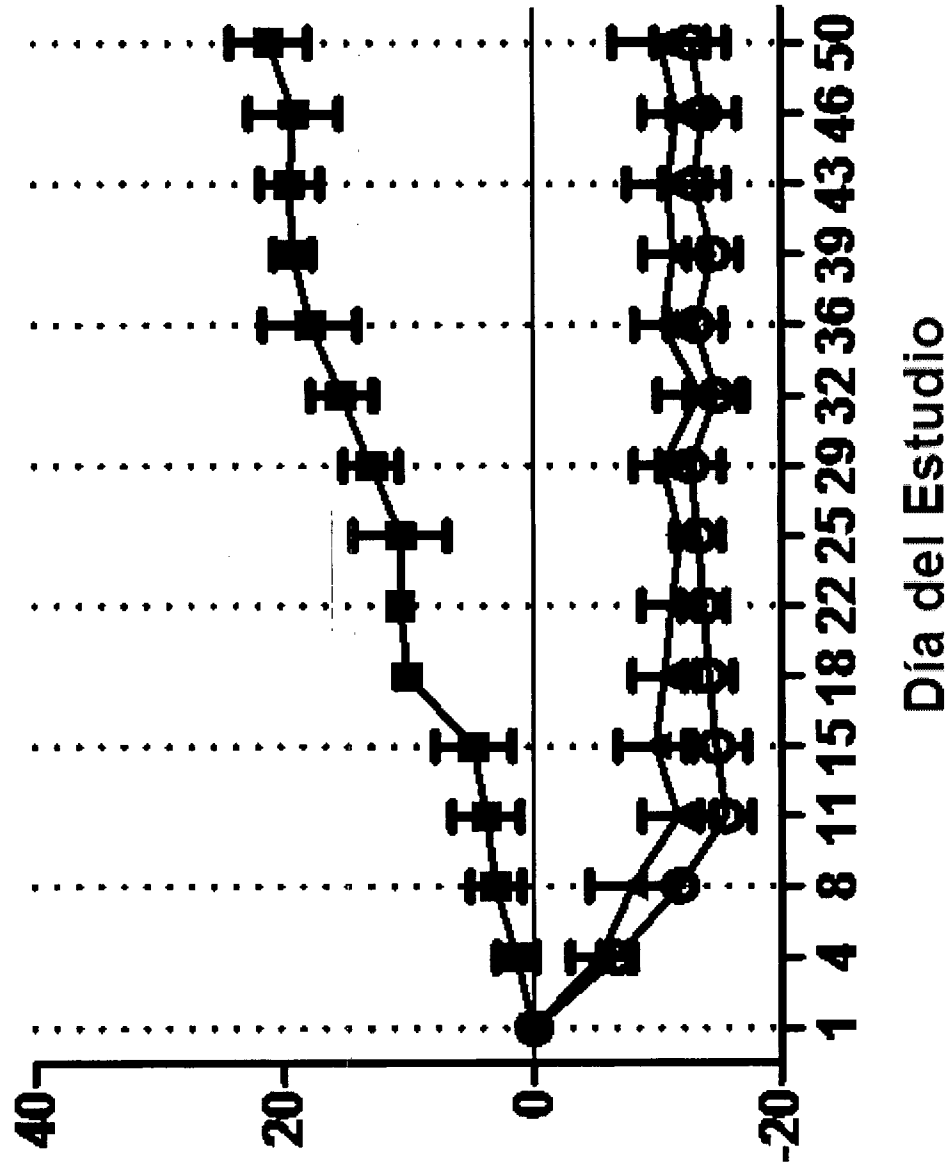
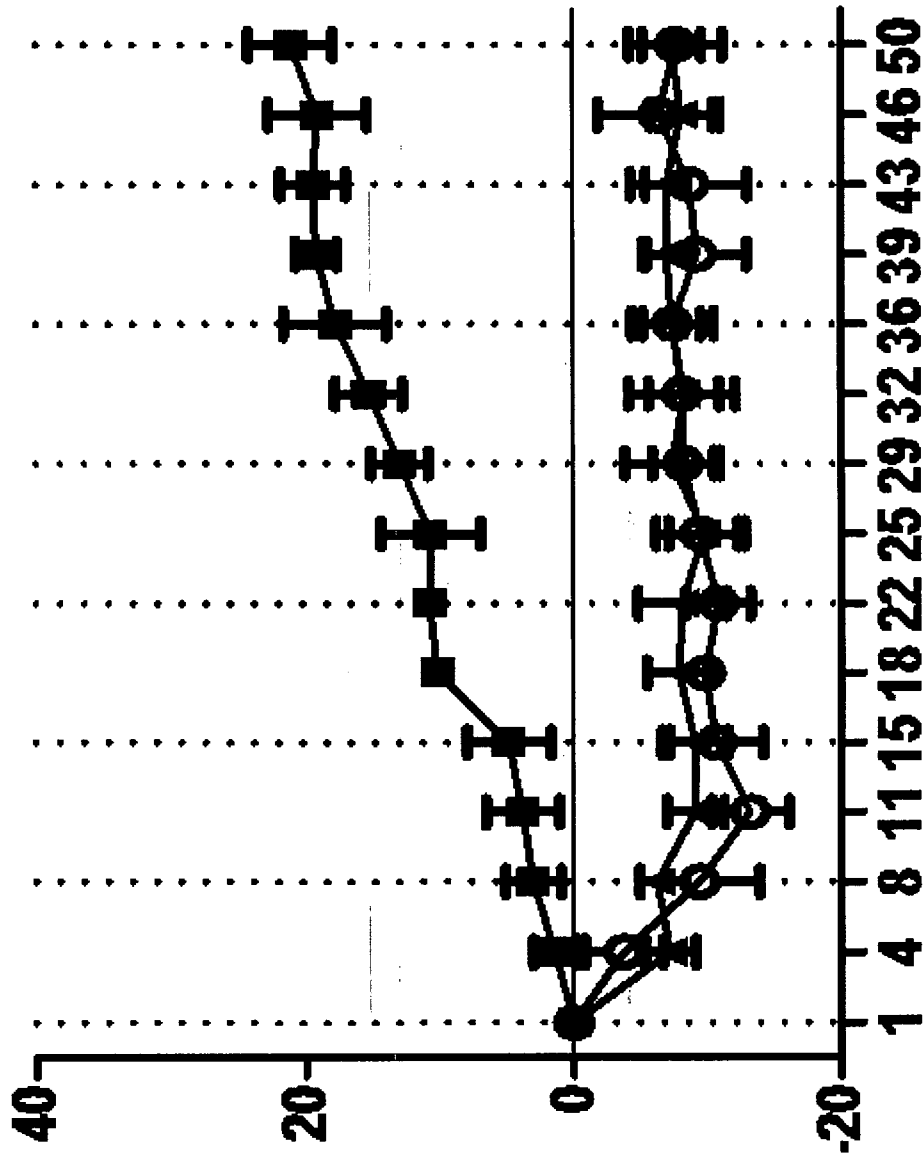


Figura19B

Promedio del cambio en el peso corporal

E91C, H125C, P171G (SC)

% de Diferencia desde la línea Base (Día 1)



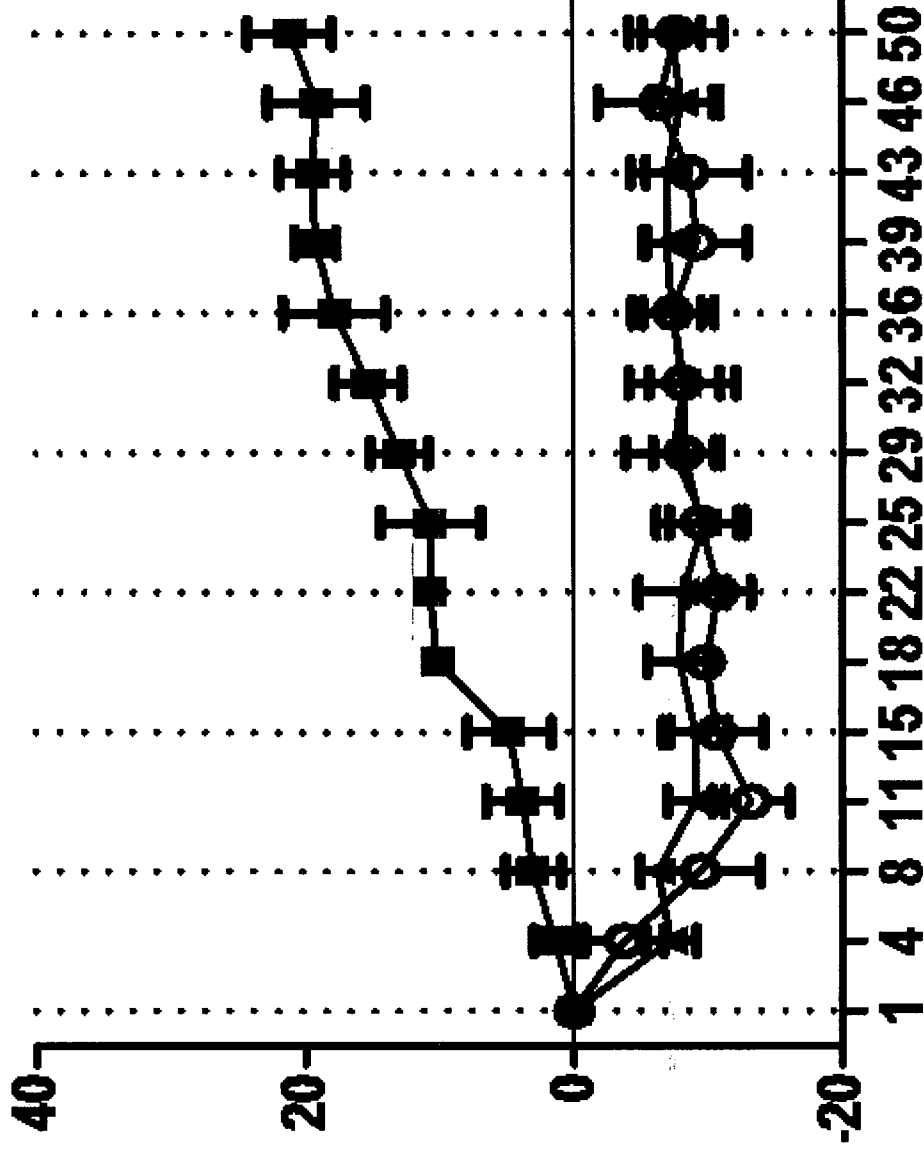
Día del Estudio

Figura 19C

Promedio del cambio en el peso corporal

E91C, H125C, P171G (SC)

% de Diferencia desde la línea Base (Día 1)



Día del Estudio

Figura 19D

114

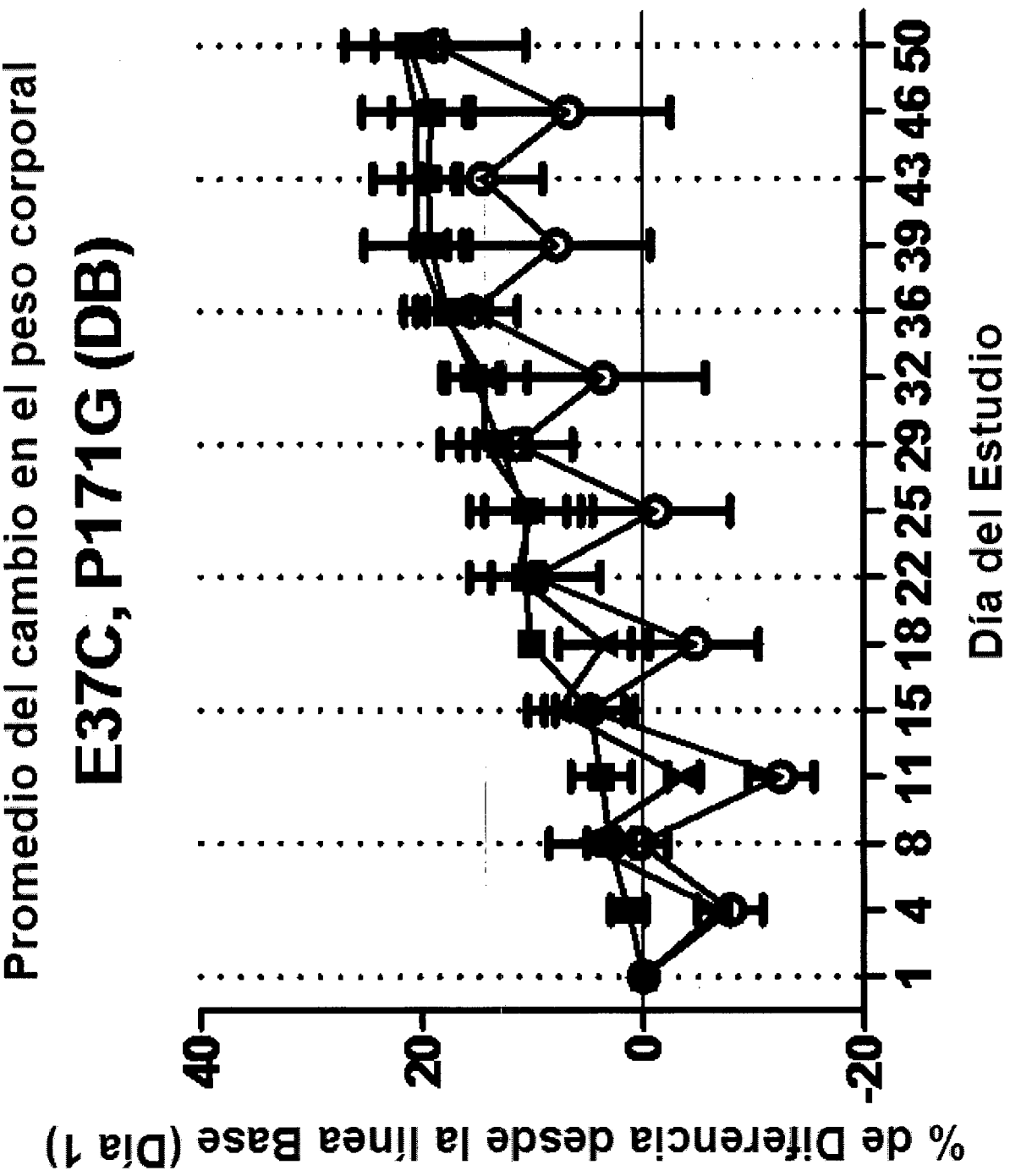


Figura 19E

Promedio del cambio en el peso corporal

R77C, P171G (DB)

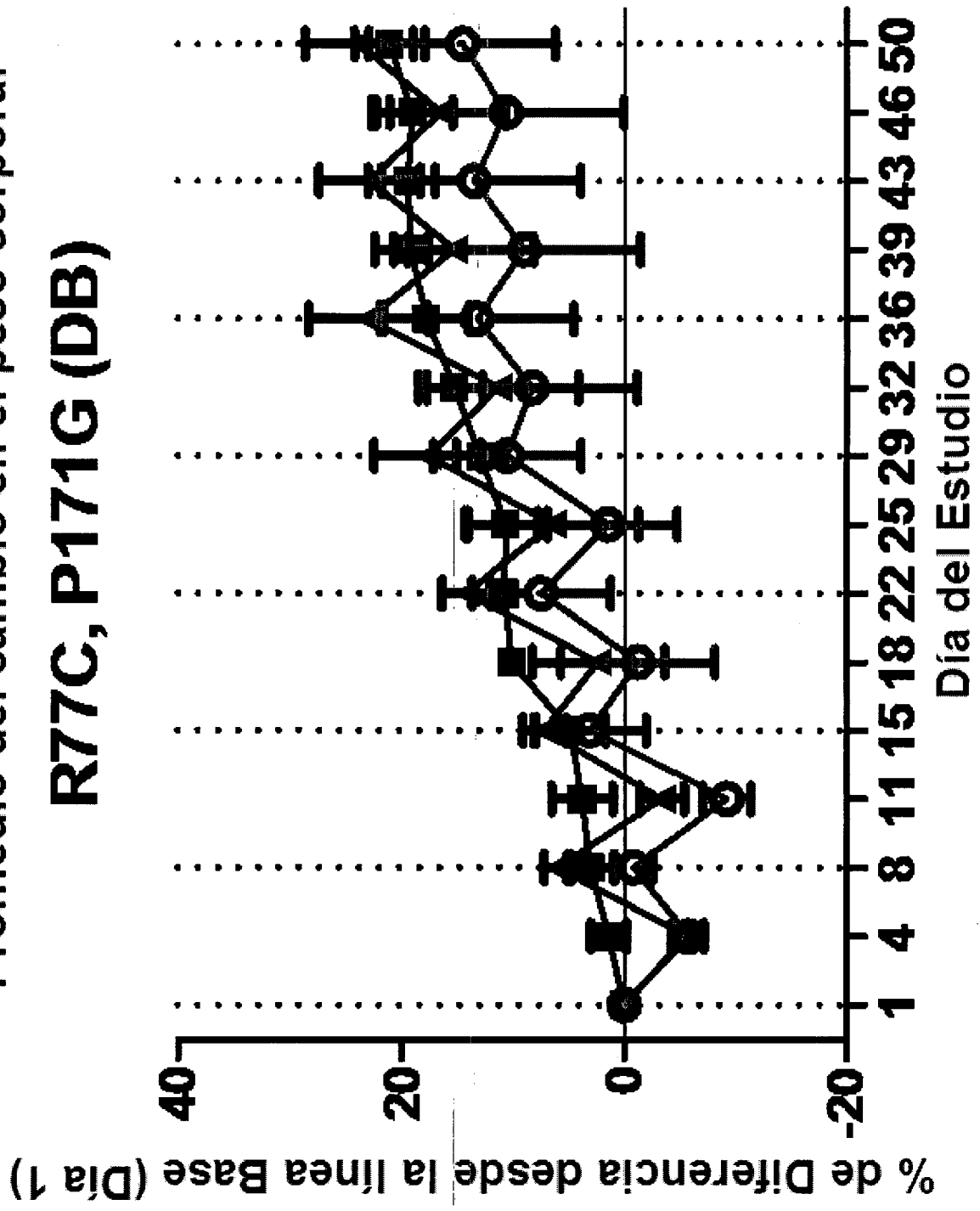
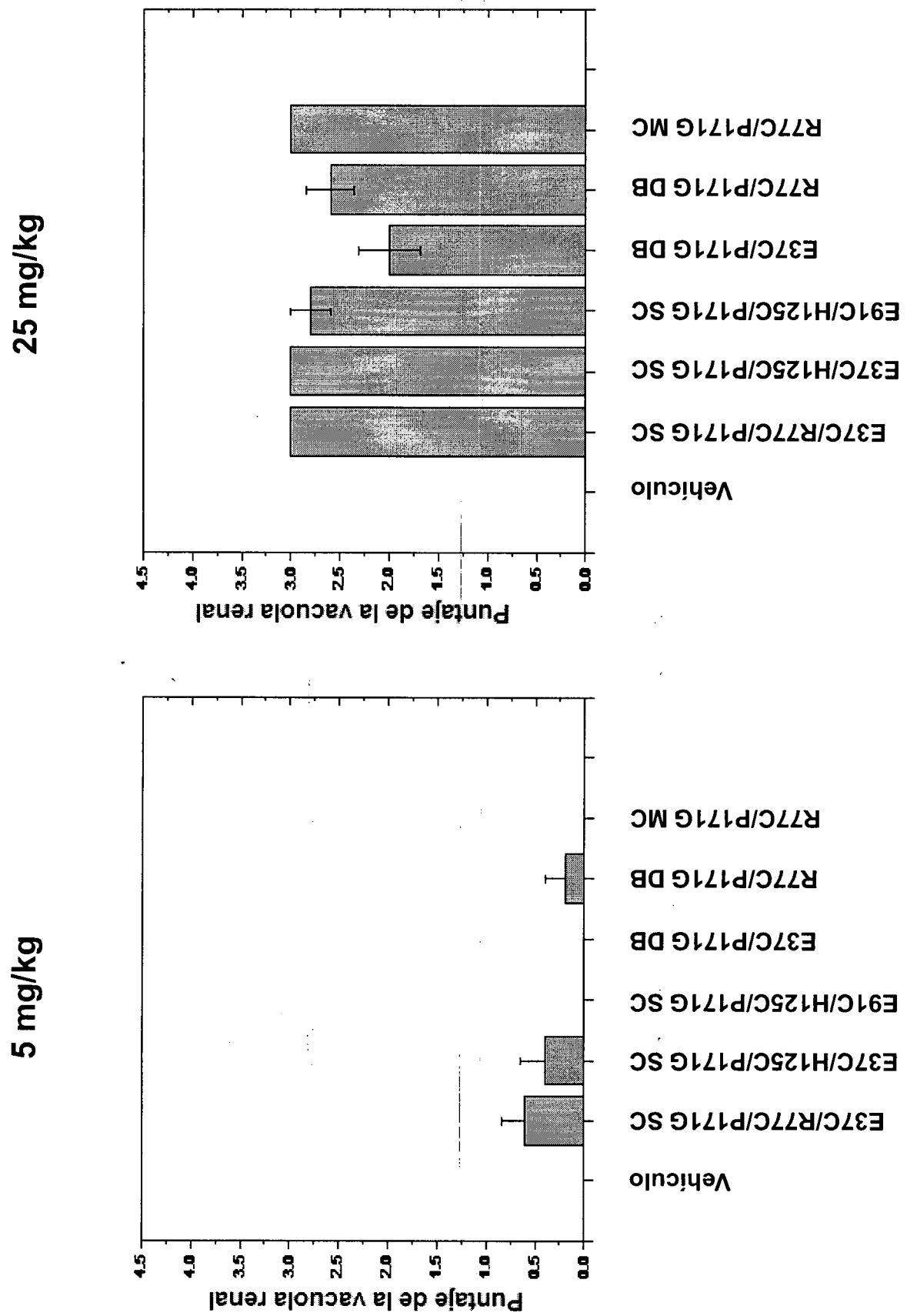


Figura 19F

211

Figura 20



P- 2878 TRADUCCION LISTADO SEC
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> WALKER, Kenneth W.
GEGG, Jr. , Colin V.
HECHT, Randy I.
BELOUSKI, Edward J.
LI, Yue-Sheng
MICHAELS, Mark L.
XU, Jing
ELLISON, Murielle M.

<120> MUTANTES FGF21 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> A-1451-US-PSP

<140> 61/195761

<141> 2008-10-10

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 630

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggactcgg acgagaccgg gttcagacac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt	60
cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc	120
gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac	180
ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc	240
ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaactt tgggagtcaa gacatccagg	300
ttcctgtgcc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc	360
tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac	420
ggcctcccg c tgcacctgcc agggaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga	480
ccagctcgct tcctgccact accaggcctg cccccgcac ccccggagcc acccggaatc	540
ctggcccccc agcccccca tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc	600
cagggccgaa gccccagcta cgcttctga	630

<210> 2

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Asp	Ser	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Glu	His	Ser	Gly	Leu	Trp	Val	Ser
1				5					10					15	

Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Gln	Ala	His	Pro	Ile	Pro
			20					25					30		

Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr
		35					40					45			

P- 2878 TRADUCCION LISTADO SEC

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
195 200 205

Ser

<210> 3
<211> 546
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3
caccccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcgggtac 60
ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gccacactgg agatcagggg ggatggggacg 120
gtgggggggctg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg 180
ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg 240
gccctgtatg gatcgtcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt 300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacggcc tcccgtgca cctgccaggg 360
aacaagtccc cacaccggga cctgcaccc cgaggaccag ctgcttctt gccactacca 420
ggcctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg 480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct 540

tcctga

546

<210> 4
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> secuencia enlazadora

120

P- 2878 TRADUCCION LISTADO SEC

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> X ES INDEPENDIENTEMENTE CUALQUIER RESIDUO DE AMINOÁCIDO

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> X ES INDEPENDIENTEMENTE CUALQUIER RESIDUO DE AMINOÁCIDO

<400> 5

Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Gly
1 5

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 6

Gly Gly Gly Gly
1

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 9

121

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

<210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 10

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 11

Gly Gly Glu Gly Gly Gly
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 12

Gly Gly Glu Glu Glu Gly Gly Gly
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 13

Gly Glu Glu Glu Gly
1 5

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

122

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 14

Gly Glu Glu Glu
1

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 15

Gly Gly Asp Gly Gly Gly
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 16

Gly Gly Asp Asp Asp Gly Gly
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora
<400> 17

Gly Asp Asp Asp Gly
1 5

<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 18

Gly Asp Asp Asp
1

<210> 19
<211> 21
<212> PRT

123

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Secuencia enlazadora

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Asp Ser Asp Glu Gly Ser Asp Gly Glu Asp
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Secuencia enlazadora

<400> 20

Trp Glu Trp Glu Trp
1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Secuencia enlazadora

<400> 21

Phe Glu Phe Glu Phe
1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Secuencia enlazadora

<400> 22

Glu Glu Glu Trp Trp Trp
1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Secuencia enlazadora

<400> 23

Glu Glu Glu Phe Phe Phe

124

1

5

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 24

Trp Trp Glu Glu Glu Trp Trp
1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<400> 25

Phe Phe Glu Glu Glu Phe Phe
1 5

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> X ES INDEPENDIENTEMENTE CUALQUIER RESIDUO DE AMINOÁCIDO

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> X ES INDEPENDIENTEMENTE CUALQUIER RESIDUO DE AMINOÁCIDO

<400> 26

Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Gly
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia enlazadora

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)

125

P- 2878 TRADUCCION LISTADO SEC

<223> X ES INDEPENDIENTEMENTE CUALQUIER RESIDUO DE AMINOÁCIDO

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> X ES INDEPENDIENTEMENTE CUALQUIER RESIDUO DE AMINOÁCIDO

<400> 27

Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gly

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Secuencia enlazadora

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> X ES INDEPENDIENTEMENTE CUALQUIER RESIDUO DE AMINOÁCIDO

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> X ES INDEPENDIENTEMENTE CUALQUIER RESIDUO DE AMINOÁCIDO

<400> 28

Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Gly

1 5

<210> 29

<211> 27

<212> ADN

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Secuencia cebadora

<400> 29

atggtggaac cttcccaggg ccgaagc

27

<210> 30

<211> 50

<212> ADN

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Secuencia cebadora

<400> 30

ctcctcggac cctctgagca tgggtgggacc ttcccagggc cgaagcccca

50

<210> 31

<211> 50

<212> ADN

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

126

<223> Secuencia cebadora

<400> 31
gaggagcctg ggagactcgt accaccctgg aagggtcccg gcttcggggt 50

<210> 32
<211> 30
<212> ADN
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia cebadora

<400> 32
ggaaggttcc accatgctca gaggggtccga 30

<210> 33
<211> 40
<212> ADN
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia cebadora

<400> 33
aggaggaata acatatgcat ccaattccag attcttctcc 40

<210> 34
<211> 33
<212> ADN
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Secuencia cebadora

<400> 34
tagtgagctc gaattcttag gaagcgtagc tgg 33

127

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 April 2010 (15.04.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/042747 A2

- (51) International Patent Classification:
C07K 14/50 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
- (21) International Application Number:
[PCT/US2009/060045]
- (22) International Filing Date:
8 October 2009 (08.10.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
[617,957,761] 10 October 2008 (10.10.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AM-
GEN INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thou-
sand Oaks, California 91320-1799 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): WALKER, Ken-
neth W. [US/US]; 175 Mesa Avenue, Newbury Park,
California 91320 (US). GEGG, Colin, V., Jr. [US/US];
736 Kenmore Circle, Newbury Park, California 91320
(US). HECHT, Randy I. [US/US]; 2569 Piccadilly Cir-
cle, Thousand Oaks, California 91362 (US). BELOUS-
KI, Edward J. [US/US]; 4541 La Tuna Court, Camarillo,
California 93012 (US). LI, Yue-Sheng [US/US]; 3025
Shadow Hill Circle, Thousand Oaks, California 91360
(US). MICHAELS, Mark L. [US/US]; 5007 Texhoma
Avenue, Encino, California 91316 (US). XU, Jing
[CN/US]; 1677 Glider Court, Thousand Oaks, California
91320 (US). ELLISON, Murielle M. [US/US]; 645
Camino Manzanitas, Thousand Oaks, California 91360
(US).
- (74) Agent: LAMERDIN, John; Amgen Inc., One Amgen
Center Drive, Mail Stop 28-2-C, Thousand Oaks, Califor-
nia 91320-1799 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:**
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii))
 - as to the applicant's entitlement to claim the priority of
the earlier application (Rule 4.17(iii))
- Published:**
- without international search report and to be republished
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
 - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: FGF21 MUTANTS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The invention provides nucleic acid molecules encoding FGF21 mutant polypeptides, FGF21 mutant polypeptides, pharmaceutical compositions comprising FGF21 mutant polypeptides, and methods for treating metabolic disorders using such nucleic acids, polypeptides, or pharmaceutical compositions.

WO 2010/042747 A2

128



No. 11-043102- -00000-0000

Fecha: 2011-04-07 15:15:46

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 128

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTIL ☐

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D' ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
AMGEN INC.

REFERENCIA	Radicación No.	11 043102
	Solicitud internacional	PCT/US2009/60045
	Fecha inicio fase nacional	10/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	08241

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 20 MAYO 2011.
adpa11