



No. 14-064516- -00000-0000

Fecha: 2014-03-26 16:45:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: PROTEÍNAS DE FUSIÓN PARA TRATAR TRASTORNOS
METABÓLICOS

SOLICITANTE: NOVARTIS AG.

DIRECCIÓN: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Suiza

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 26 de marzo de 2014

P2014/000041



No. 14-064516-00000-0000

Fecha: 2014-03-26 16:45:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2014/000041

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **NOVARTIS AG**

Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel

Nacionalidad o Domicilio: Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/057384

Fecha Septiembre 26, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/049247

Fecha Abril 04, 2013

6

Título (54) **PROTEÍNAS DE FUSIÓN PARA TRATAR TRASTORNOS METABÓLICOS**

Clasificación Internacional (51) A61K 47/48, C07K 14/50

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Septiembre 26, 2011

(31) Número de
Solicitud

61/539,280

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha _____

10

ANEXOS

☒

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. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

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 del 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 depósito 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.

☐

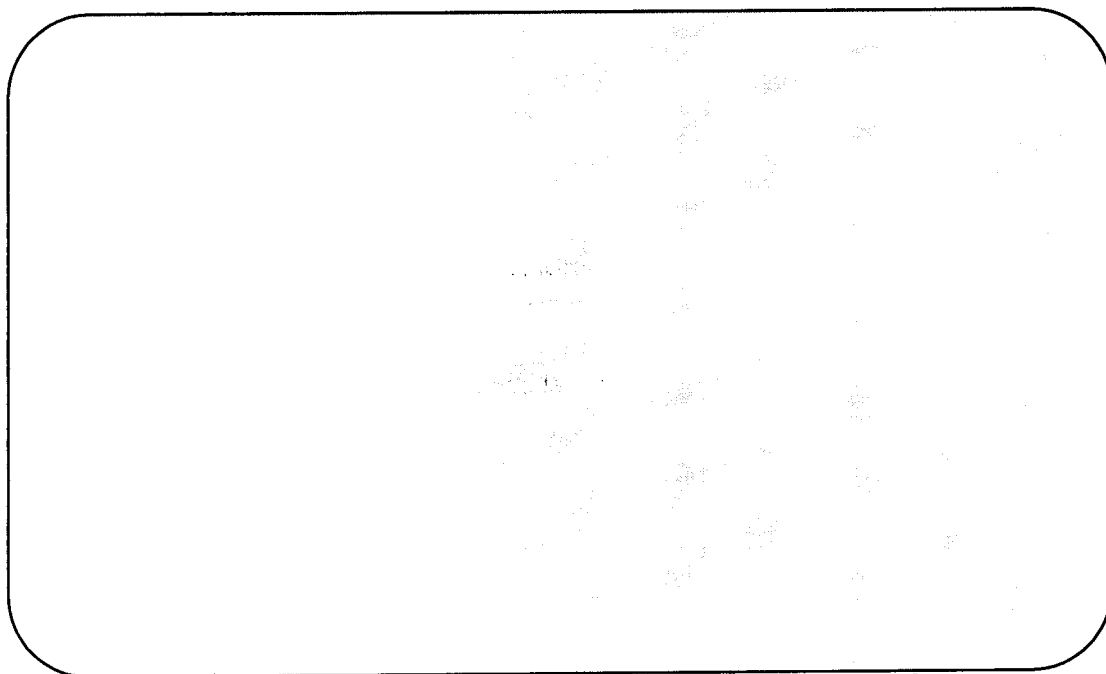
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/057384

Brian R. BOETTCHER

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Shari L. CAPLAN

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Douglas S. DANIELS

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Norio HAMAMATSU

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Japonesa

Stuart LICHT

100 Memorial Drive,
Apt. 2-9B, Cambridge,
Massachusetts 02142
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Stephen Craig WELDON

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0029536

Bogotá D.C., Marzo 17 de 2014 - 13:53:00

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	609953573	14/03/2014	17.818.250.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1. TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-064516-00000-0000
Fecha: 2014-03-26 16:45:15 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

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 17 de 2014 - 13:57:33

5

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: <u>2014</u> / <u>03</u> / <u>26</u> AAAA MM DD	
		Recorrido: 4	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-64516	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
☒	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones: EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 8 ARCHIVOS: 8 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS. EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO <u>(5)</u>

[Handwritten signature]

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	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 ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-064516- -00000-0000

Fecha: 2014-03-26 16:45:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

PI02-F08 (2009-11-18)



PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2014/000041

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **NOVARTIS AG**
Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel
Nacionalidad o Domicilio: Suiza
Lugar de Constitución: Suiza
Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.
Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/057384 Fecha Septiembre 26, 2012
Publicación Internacional No. WO 2013/049247 Fecha Abril 04, 2013

6

Título (54) **PROTEÍNAS DE FUSIÓN PARA TRATAR TRASTORNOS METABÓLICOS**

Clasificación Internacional (51) A61K 47/48, C07K 14/50

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Septiembre 26, 2011

(31) Número de
Solicitud

61/539,280

9

Comprobante de pago No. 14- Fecha _____



ANEXOS

☒

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. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

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 del 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 depósito 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. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/057384

Brian R. BOETTCHER

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Shari L. CAPLAN

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Douglas S. DANIELS

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Norio HAMAMATSU

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Japonesa

Stuart LICHT

100 Memorial Drive,
Apt. 2-9B, Cambridge,
Massachusetts 02142
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Stephen Craig WELDON

100 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Novartis AG a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

1. En esta fecha, día 30 de Agosto de 2006, yo, el suscrito Notario Público certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas del señor Arthur Canonica, ciudadano de Corticiasca, Suiza, residente en Wisen/SO, Suiza, y del Sr. Pascal Traub, ciudadano de Riehen, Suiza, residente en Basilea, Suiza, ambos personas mayores de edad y con dirección comercial en Lichstrasse 35, 4056, Basilea, Suiza. La autenticidad de la firmas fue establecida por medio de la comparación.
2. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas han ejecutado el anterior documento como apoderados de Novartis AG.
3. Además, yo, el Notario Público certifico por el presente que Novartis AG, con su principal lugar de negocios en Basilea, Suiza, está debidamente constituida, está actualmente vigente y que los propósitos para los cuales se otorgó el Documento de Poder están dentro del alcance de sus propósitos corporativos.



4. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas tienen la autoridad para ejecutar el documento de Poder y que por este instrumento, su representación es legal.

La base para mis certificaciones de los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos:

- Documento de Poder de Novartis AG fechado el 19 de junio de 2006 y
- Extracto del Registro de Comercio del Cantón de la ciudad de Basilea para Novartis AG, en Basilea, fechado el 25 de enero de 2006.

Basilea, Suiza, este día 30 de Agosto de 2006.

(Firmado) Dr. Matthias Staehelin, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea, Suiza.

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

Hay una Apostilla de Suiza, firmada por Heidi Fischer, bajo el No. 8049/13584.



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Novartis"

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8346



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

NOVARTIS AG

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel / Switzerland

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Date/Fecha: June 27, 2006

City/Country/Ciudad,País: Basel, Switzerland


Arthur Canonica


Pascal Traub

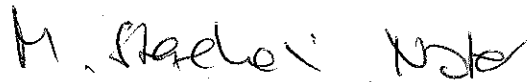
Attestation

- 1 On this date, the 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six), I, the undersigned Notary Public certify herewith the authenticity of the signatures of **Mr. Arthur Canonica**, citizen of Corticiasca, Switzerland, residing in Wisen/SO, Switzerland and of **Mr. Pascal Traub**, citizen of Riehen, Switzerland, residing in Basel, Switzerland, both of legal age and with business address at, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland. The authenticity of the signatures was established by means of comparison.
- 2 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have executed the foregoing document as proxy holders for Novartis AG.
- 3 Further, I, the Notary Public certify herewith that Novartis AG, having its principal place of business located in Basel / Switzerland, is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
- 4 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have the authority to execute the Power of Attorney and that for this instrument their representation is legal.

The foundation for my certifications contained in points 2 (two), 3 (three) and 4 (four) was the exhibition of the following authentic documents:

- Power of Attorney by Novartis AG dated June 19 (nineteen), 2006 (two thousand and six); and
- Extract from the Register of Commerce of the Canton of Basel-City for Novartis AG, in Basel, dated January 25 (twenty-five), 2006 (two thousand and six).

BASEL, Switzerland, this 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six)



Dr. Matthias Staehelin, Notary Public
in the Canton of Basel-City, Switzerland

My license expires on March 11 (eleven),
2009 (two thousand and nine).

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *P. in*

3. in his/her function as *St. Stettelin*

4. and certified by the seal of the *St. Stettelin*

Certified 20. Aug. 2006

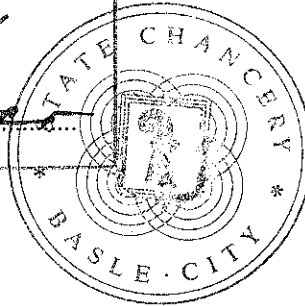
5. in Basel (Bâle) 6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. no. *2009/18584*

9. Seal / stamp: 10. Signature: *Fischer*

Heidi Fischer





- (51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01) *C07K 14/50* (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2012/057384
- (22) International Filing Date:
26 September 2012 (26.09.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/539,280 26 September 2011 (26.09.2011) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).
- (72) Inventors; and
- (71) Applicants (for US only): **BOETTCHER, Brian R.** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **CAPLAN, Shari L.** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **DANIELS, Douglas S.** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **HAMAMATSU, Norio** [JP/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **LICHT, Stuart** [US/US]; 100 Memorial Drive, Apt. 2-9B, Cambridge, Massachusetts 02142 (US). **WELDON, Stephen Craig** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US).

- (74) Agent: **PAGLIERANI, Paul J.**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 220 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: FUSION PROTEINS FOR TREATING METABOLIC DISORDERS

(57) Abstract: The invention relates to the identification of fusion proteins comprising polypeptide and protein variants of fibroblast growth factor 21 (FGF21) with improved pharmaceutical properties. Also disclosed are methods for treating FGF21-associated disorders, including metabolic conditions.



FUSION PROTEINS FOR TREATING METABOLIC DISORDERS

FIELD OF THE INVENTION

5 **[0001]** The present invention relates to new fusion proteins comprising fibroblast growth factor 21 (FGF21) known to improve metabolic profiles in subjects to whom they are administered.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 **[0002]** The fibroblast growth factor (FGF) family is characterized by 22 genetically distinct, homologous ligands, which are grouped into seven subfamilies. FGF-21 is most closely related to, and forms a subfamily with, FGF-19 and FGF-23. This FGF subfamily regulates diverse physiological processes uncommon to classical FGFs, namely energy and bile acid homeostasis, glucose and lipid metabolism, and phosphate
15 as well as vitamin D homeostasis. Moreover, unlike other FGFs, this subfamily acts in an endocrine fashion. (Moore, D.D. (2007) Science 316, 1436-8)(Beenken et al. (2009) Nature Reviews Drug Discovery 8, 235).

[0003] FGF21 is a 209 amino acid polypeptide containing a 28 amino acid leader sequence (SEQ ID NO:5). Human FGF21 has about 79% amino acid identity to mouse
20 FGF21 and about 80% amino acid identity to rat FGF21. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) has been described as a treatment for ischemic vascular disease, wound healing, and diseases associated with loss of pulmonary, bronchia or alveolar cell function. (Nishimura et al. (2000) Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206; patent publication WO01/36640; and patent publication WO01/18172) Although FGF-21
25 activates FGF receptors and downstream signaling molecules, including FRS2a and ERK, direct interaction of FGFRs and FGF-21 has not been detected. Studies have identified β -klotho, which is highly expressed in liver, adipocytes and pancreas, as a determinant of the cellular response to FGF-21 and a cofactor which mediates FGF-21 signaling through FGFRs (Kurosu, H. et al. (2007) J Biol Chem 282, 26687-95). FGF21
30 is a potent agonist of the FGFR1(IIIc), FGFR2(IIIc) and FGFR3(IIIc) β -klotho signaling complexes.

[0004] FGF-21 has been shown to induce insulin-independent glucose uptake. FGF-21 has also been shown to ameliorate hyperglycemia in a range of diabetic rodent models. In addition, transgenic mice over-expressing FGF-21 were found to be
35 resistant to diet-induced metabolic abnormalities, and demonstrated decreased body weight and fat mass, and enhancements in insulin sensitivity (Badman, M.K. et al. (2007) Cell Metab 5, 426-37). Administration of FGF-21 to diabetic non-human primates

caused a decline in fasting plasma glucose, triglycerides, insulin and glucagon levels, and led to significant improvements in lipoprotein profiles including a nearly 80% increase in HDL cholesterol (Kharitononkov, A. et al. (2007) *Endocrinology* 148, 774-81). Recent studies investigating the molecular mechanisms of FGF21 action have
5 identified FGF21 as an important endocrine hormone that helps to control adaptation to the fasting state. (Badman et al. (2009) *Endocrinology* 150, 4931)(Inagaki et al. (2007) *Cell Metabolism* 5, 415) This provides a previously missing link downstream of PPAR α , by which the liver communicates with the rest of the body in regulating the biology of energy homeostasis. (Galman et al. (2008) *Cell Metabolism* 8, 169)(Lundasen et al.
10 (2007) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, 437).

[0005] FGF21 regulates adipocyte homeostasis through activation of an AMPK/SIRT1/PGC1 α pathway to inhibit PPAR γ expression and increase mitochondrial function. (Chau et al. (2010) *PNAS* 107, 12553) FGF21 also increases glucose uptake by skeletal muscle as measured in cultured human myotubes and isolated mouse
15 tissue. FGF21 treatment of rodent islet cells leads to improved function and survival through activation of ERK1/2 and Akt pathways. (Wente et al. (2006) *Diabetes* 55, 2470) FGF21 treatment also results in altered gene expression for lipogenesis and fatty acid oxidation enzymes in rodent livers, likely through HNF4 α and Foxa2 signaling.

[0006] A difficulty associated with using FGF-21 directly as a biotherapeutic is that its
20 half-life is very short. (Kharitononkov, A. et al. (2005) *Journal of Clinical Investigation* 115:1627-1635) In mice, the half-life of human FGF21 is 0.5 to 1 hours, and in cynomolgus monkeys, the half-life is 2 to 3 hours. FGF21 may be utilized as a multi-use, sterile pharmaceutical formulation. However, it has been determined that preservatives, i.e., m-cresol, have an adverse affect on its stability under these
25 conditions.

[0007] In developing an FGF21 protein for use as a therapeutic in the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus and other metabolic conditions, an increase in half-life and stability would be desirable. FGF21 proteins having enhanced half-life and stability would allow for less frequent dosing of patients being administered the protein.
30 Clearly, there is a need to develop a stable aqueous protein formulation for the therapeutic protein FGF21.

[0008] Furthermore, significant challenge in the development of FGF21 as a protein pharmaceuticals, is to cope with its physical and chemical instabilities. The compositional variety and characteristics of proteins define specific behaviors such as
35 folding, conformational stability, and unfolding/denaturation. Such characteristics should be addressed when aiming to stabilize proteins in the course of developing pharmaceutical formulation conditions utilizing aqueous protein solutions (Wang, W., Int.

J. of Pharmaceutics, 18, (1999)). A desired effect of stabilizing therapeutic proteins of interest, e.g., the proteins of the present invention, is increasing resistance to proteolysis and enzymatic degradation, thereby improving protein stability and reducing protein aggregation.

5

SUMMARY OF THE INVENTION

- [0009]** The invention relates to the identification of new fusion proteins which comprise fibroblast growth factor 21 (FGF21) and which have improved pharmaceutical properties over the wild-type FGF21 and variants thereof under pharmaceutical formulation conditions, e.g., are more stable, possess the ability to improve metabolic parameters for subjects to whom they are administered, are less susceptible to proteolysis and enzymatic degradation, and are less likely to aggregate and form complexes. The fusion proteins of the invention comprise truncations, mutations, and variants of FGF21.
- 10 **[0010]** Also disclosed are methods for treating FGF21-associated disorders, as well as other metabolic, endocrine, and cardiovascular disorders, such as obesity, type 1 and type 2 diabetes mellitus, pancreatitis, dyslipidemia, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), nonalcoholic steatohepatitis (NASH), insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose intolerance, hyperglycemia, metabolic syndrome, acute myocardial infarction, hypertension, cardiovascular disease, atherosclerosis, peripheral arterial disease, stroke, heart failure, coronary heart disease, kidney disease, diabetic complications, neuropathy, gastroparesis, disorders associated with severe inactivating mutations in the insulin receptor, and other metabolic disorders, and in reducing the mortality and morbidity of critically ill patients.
- 20 **[0011]** The fusion proteins of the present invention may be used as a once weekly injectable either alone or in combination with oral anti-diabetic agents which will improve the glycemic control, body weight and lipid profile of type 1 and type 2 diabetes mellitus patients. The proteins may also be used for the treatment of obesity or other FGF21-associated conditions.
- 25 **[0012]** The fusion proteins of the invention overcome the significant hurdles of physical instabilities associated with protein therapeutics, including, for instance, with the administration of the wild-type FGF21, by presenting proteins which are more stable, less susceptible to proteolysis and enzymatic degradation, and less likely to aggregate and form complexes, than wild-type FGF21 under pharmaceutical formulation conditions.
- 30 **[0013]** In a first aspect, the invention provides Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) fusion proteins comprising one or more of the sequences listed in Table 1, and further
- 35

described herein. The FGF21 sequences listed in Table 1 may be variants of the wild-type FGF21 sequence, e.g., the wild-type FGF21 sequence with NCBI reference number NP_061986.1, and found in such issued patents as, e.g., US 6,716,626B1, assigned to Chiron Corporation.

5 **[00014]** Said fusions may be, for example, between the variant FGF21 sequences, e.g., the sequences of Table 1, and other molecules (a non-FGF21 portion), e.g., an IgG constant domain or fragment thereof (e.g., the Fc region), Human Serum Albumin (HSA), or albumin-binding polypeptides. In a preferred embodiment, the non-FGF21 portion of the molecule is an Fc region.

10 **[00015]** Other embodiments are drawn to polynucleotides encoding the fusion proteins of the invention, a vector containing said polynucleotides and a host cell carrying said vector.

[00016] Provided herein are methods used to generate the fusion proteins of the invention, wherein such methods involve modification of the wild-type FGF21 protein, via e.g., the site-specific incorporation of amino acids at positions of interest within the wild-type FGF21 protein, as well as the fusion between the FGF21 portion of the molecule to other molecules, e.g., an IgG constant domain or fragment thereof (e.g., the Fc region), Human Serum Albumin (HSA), or albumin-binding polypeptides. Said modifications and fusions enhance the biological properties of the fusion proteins of the invention relative to the wild-type versions of the proteins as well as, in some cases, serving as points of attachment for, e.g., labels and protein half-life extension agents, and for purposes of affixing said variants to the surface of a solid support. Related embodiments of the invention are methods to produce cells capable of producing said proteins of the invention, and of producing vectors containing DNA encoding said variants and fusions.

25 **[00017]** In various embodiments, the fusion proteins of the invention disclosed herein can comprise one or more fragments of the FGF21 wild-type sequences, including fragments as small as 8-12 amino acid residues in length, and wherein the polypeptide is capable of lowering blood glucose in a mammal. In various embodiments, the fusion proteins of the invention disclosed herein can comprise one or more variant of the FGF21 wild-type sequences, e.g., with one or more amino acid deletion, insertion, addition, or substitution relative to the wild-type sequences thereof.

30 **[00018]** In some embodiments, the fusion proteins of the invention disclosed herein can be covalently linked to one or more polymers, such as polyethylene glycol (PEG) or polysialic acid, whether at the position of site-specific amino acid modifications made relative to the wild-type FGF21, or at the position of amino acids commonly shared with the wild-type versions of those proteins. The PEG group is attached in such a way so

as enhance, and/or not to interfere with, the biological function of the constituent portions of the fusion proteins of the invention, e.g., the FGF21 protein variants. In other embodiments, the polypeptides of the invention can be fused to a heterologous amino acid sequence, optionally via a linker, such as GS, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:6). The heterologous amino acid sequence can be an IgG constant domain or fragment thereof (e.g., the Fc region), Human Serum Albumin (HSA), or albumin-binding polypeptides. Such fusion proteins disclosed herein can also form multimers.

[00019] In some embodiments, a heterologous amino acid sequence (e.g., HSA, Fc, etc.) is fused to the amino-terminal of the fusion proteins of the invention. In other embodiments, the fusion heterologous amino acid sequence (e.g., HSA, Fc, etc.) is fused to the carboxyl-terminal of the fusion proteins of the invention.

[00020] Yet another embodiment is drawn to methods of treating a patient exhibiting one or more FGF21-associated disorders, such as obesity, type 2 diabetes mellitus, type 1 diabetes mellitus, pancreatitis, dyslipidemia, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), nonalcoholic steatohepatitis (NASH), insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose intolerance, hyperglycemia, metabolic syndrome, acute myocardial infarction, hypertension, cardiovascular disease, atherosclerosis, peripheral arterial disease, stroke, heart failure, coronary heart disease, kidney disease, diabetic complications, neuropathy, gastroparesis, disorders associated with inactivating mutations in the insulin receptor, and other metabolic disorders, comprising administering to said patient in need of such treatment a therapeutically effective amount of one or more proteins of the invention or a pharmaceutical composition thereof.

[00021] The invention also provides pharmaceutical compositions comprising the fusion proteins of the invention disclosed herein and a pharmaceutically acceptable formulation agent. Such pharmaceutical compositions can be used in a method for treating a metabolic disorder, and the method comprises administering to a human patient in need thereof a pharmaceutical composition of the invention. Non-limiting examples of metabolic disorders that can be treated include type 1 and type 2 diabetes mellitus and obesity.

[00022] These and other aspects of the invention will be elucidated in the following detailed description of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[00023] **Figures 1A-1D** show V188 has improved efficacy in the ob/ob diabetic mouse model over V76. V188 shows superior results when administered at 1 milligram per kilogram (mpk), compared to the 5 milligram per kilogram at which V76 was

administered. **Figure 1A** shows fed plasma glucose as a readout (circles represent vehicle (PBS – phosphate buffered saline), squares represent V76 at 5 mpk, and triangles represent V188 at 1 mpk). **Figure 1B** shows fed plasma insulin as a readout (from left to right: vehicle, V76 at 5 mpk, and V188 at 1 mpk). **Figure 1C** shows body weight as a readout (from left to right: vehicle, V76 at 5 mpk, and V188 at 1 mpk). **Figure 1D** shows liver lipid content as a readout (from left to right: vehicle, V76 at 5 mpk, and V188 at 1 mpk).

[00024] **Figures 2A-2D** show V101 has improved efficacy in the ob/ob diabetic mouse model over V76. V101 shows superior results when administered at 1 milligram per kilogram (mpk), compared to the 5 milligram per kilogram at which V76 was administered. **Figure 2A** shows fed plasma glucose as a readout (circles represent vehicle (PBS – phosphate buffered saline), squares represent V76 at 5 mpk, and triangles represent V101 at 1 mpk). **Figure 2B** shows fed plasma insulin as a readout (from left to right: vehicle, V76 at 5 mpk, and V101 at 1 mpk). **Figure 2C** shows body weight as a readout (from left to right: vehicle, V76 at 5 mpk, and V101 at 1 mpk). **Figure 2D** shows liver lipid content as a readout (from left to right: vehicle, V76 at 5 mpk, and V101 at 1 mpk).

[00025] **Figures 3A-3D** show V103 has improved efficacy in the ob/ob diabetic mouse model over V76. V103 shows superior results when administered at 1 milligram per kilogram (mpk), compared to the 5 milligram per kilogram at which V76 was administered. **Figure 3A** shows fed plasma glucose as a readout (circles represent vehicle (PBS – phosphate buffered saline), squares represent V76 at 5 mpk, and triangles represent V103 at 1 mpk). **Figure 3B** shows fed plasma insulin as a readout (from left to right: vehicle, V76 at 5 mpk, and V103 at 1 mpk). **Figure 3C** shows body weight as a readout (from left to right: vehicle, V76 at 5 mpk, and V103 at 1 mpk). **Figure 3D** shows liver lipid content as a readout (from left to right: vehicle, V76 at 5 mpk, and V103 at 1 mpk).

[00026] **Figures 4A-4D** demonstrate the superior pharmacokinetic and thermodynamic properties possessed by the fusion proteins of the invention over FGF21 fusion proteins in the art. **Figure 4A** shows the plasma concentrations of fusion proteins of the invention in PCT Publication WO10/129600 described as Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G) and Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) , following the IV injection of said fusion in mice. **Figure 4B** shows pharmacokinetic properties of the fusion proteins of the invention (V101, V103 & V188) after a single IV dose in the mouse as assayed by anti-Fc-ELISA compared with pharmacokinetic data generated in the mouse for V76 in a previous study using an anti-FGF21 antibody ELISA. **Figure 4C** shows a spot check of the fusion proteins of the invention in an anti-FGF21 Western blot, consistent with anti-

Fc-ELISA data at 120 hours and 15 days. The samples in the blot are as follows: A represents V101, B represents V103, and C represents V188. Control is V101 and serum. **Figure 4D** demonstrates the significantly increased thermodynamic stability of the fusion proteins of the invention compared to V76. From top to bottom, the figure
 5 represents V101, V103, and V188, all of which have improved melting temperatures (T_m) compared to V76 ($T_m < 50$ °C (not shown)) and wild-type FGF21 ($T_m = 46.5$ °C $\pm$ 0.3 (not shown)).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 **[00027]** The fusion proteins of the present invention represent modified versions of the full length, wild-type FGF21 polypeptide, as known in the art. FGF21 wild-type sequence will serve as a reference sequence (SEQ ID NO:1), for instance, when comparisons between the FGF21 wild-type sequence and the protein variants are necessary. The FGF21 wild-type sequence has NCBI reference sequence number
 15 NP_061986.1, and can be found in such issued patents as, e.g., US 6,716,626B1, assigned to Chiron Corporation (SEQ ID NO:1).

	Met	Asp	Ser	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Glu	His	Ser	Gly	Leu	Trp	Val	Ser	
	1				5				10					15			
20	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				
	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg		
25		50					55				60						
	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	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			
30	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	
35		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	Leu	Pro	Glu	
				165					170					175			
40	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				
45	Ser																
	209																

[00028] The corresponding mRNA sequence coding for the full-length FGF21 polypeptide (NCBI reference sequence number NM_019113.2) is shown below (SEQ ID NO:2)

```

      1 ctgtcagctg aggatccagc cgaaagagga gccaggcact caggccacct gagtctactc
     61 acctggacaa ctggaatctg gcaccaattc taaaccactc agcttctccg agctcacacc
    121 cccgagatca cctgaggacc cgagccattg atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac
5   181 tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt cttctgctgg gagcctgccg ggcacacccc
     241 atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac
     301 acagatgatg cccagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg
     361 ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gccggggagtt
    421 attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg ttctgtgccc agcggccaga tggggccctg
10  481 tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac
     541 ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac ggcctcccgc tgcacctgcc agggaacaag
     601 tccccacacc gggaccctgc accccgagga ccagctcgct tcttgccact accaggcctg
     661 cccccgcac tcccggagcc acccgaatc ctggccccc agcccccca tgtgggctcc
    721 tccgaccctc tgagcatggt gggaccttcc cagggccgaa gcccagcta cgcttctga
15  781 agccagagggc tgtttactat gacatctcct ctttatattat taggttattt atcttattta
     841 tttttttatt tttcttactt gagataataa agagttccag aggagaaaaa aaaaaaaaaa
     901 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

[00029] The mature FGF21 sequence lacks a leader sequence and may also include other modifications of a polypeptide such as proteolytic processing of the amino terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxyl terminus, cleavage of a smaller polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and other post-translational modifications understood by those with skill in the art. A representative example of a mature FGF21 sequence has the following sequence (SEQ ID NO:3, which represents amino acid positions 29-209 of full length FGF21 protein sequence (NCBI reference sequence number NP_061986.1)):

```

      His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
      5          10          15
30   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
35   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
40   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
45   Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
      130          135          140
      Ala Leu 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

```

Pro Ser Tyr Ala Ser 165 170 175
180

5 **[00030]** The corresponding cDNA sequence coding for the mature FGF21 polypeptide (SEQ ID NO:3) is shown below (SEQ ID NO:4):

10

```
1  caccgccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtac
61 ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gccacactgg agatcaggga ggatgggacg
121 gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg
181 ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg
240 gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttcgggga gctgcttctt
301 gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacggcc tcccgtgca cctgccaggg
360 aacaagtccc cacaccgga ccctgcaccc cgaggaccag ctgccttcct gccactacca
421 ggctgcccc ccgcactccc ggagccaccc ggaatcctgg ccccccagcc ccccgatgtg
15
```

481 ggctcctcgg accctctgag catgggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct

541 tcctga

[00031] The fusion proteins of the invention may comprise protein variants or mutants of the wild-type proteins listed herein, e.g., FGF21 variants. As used herein, the terms “protein variant,” “human variant,” “polypeptide or protein variant,” “variant,” “mutant,” as well as any like terms or specific versions thereof (e.g., “FGF21 protein variant,” “variant,” “FGF21 mutant,” etc.) define protein or polypeptide sequences that comprise modifications, truncations, other variants of naturally occurring (i.e., wild-type) protein or polypeptide counterparts or corresponding native sequences. “Variant FGF21” or “FGF21 mutant,” for instance, is described relative to the wild-type (i.e., naturally occurring) FGF21 protein as described herein.

[00032] Representative fusion protein sequences of the invention are listed in Table 1. The descriptions of said fusions include the FGF21 variant and, where applicable, a linker. The changes or substitutions employed by the FGF21 variant are numbered and described relative to wild-type FGF21. By way of example, "Variant 101 (V101)" (SEQ ID NO:10) is an Fc-FGF21 fusion with a two amino acid linker and the following substitutions made relative to wild type FGF21: Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, P174L, S195A, P199G, G202A.

35

Table 1: FGF21 Variant Fc fusion proteins

SEQ ID NO:	Sequence	Name*
7	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGS D SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD AQQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGLYGS LHFDPACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPGNKSPH RDPAPRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LSMVGPSQGR SPSYAS	Full Length N-term Fc-Fusion with 2 AA Linker (GS) and WT FGF21
8	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG GSDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDAQQTEAH LEIREGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVG S DPLSMVGPS QGRSPSYAS	Full Length N-term Fc-Fusion with 15 AA Linker (GGGG x 3) between Fc and WT FGF21
9	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALY SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Variant #76 = Protein with 9 total mutations relative to wild-type FGF21 (as in WO01/018172)
10	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGS D SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGTLYGS LHFDPACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LAMVGSSQAR SPSYAS	Variant # 101 = N-term Fc Fusion with the 2 AA linker (GS) between Fc and FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

11	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGSD</u> SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD <u>ACQTEAHLEI</u> REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC <u>QK</u> PDGALYGS LHFDPACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSDDP <u>LAMVGSQAR</u> SPSYAS	Variant # 103 = N-term Fc Fusion with the 2 AA linker (GS) = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
12	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGGG</u> <u>GSGGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQKPDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPCNR SPHRDPA ~~S~~ RG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGS <u>QAR</u> SPSYAS	Variant #188 = V103 with 15 AA Linker (GGGS x 3) between Fc and FGF21 = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
13	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGGG</u> <u>GSGGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGT ~~L~~ YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPCNR SPHRDPA ~~S~~ RG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGS <u>QAR</u> SPSYAS	Variant #204 = V101 with 15 AA Linker (GGGS x 3) between Fc and FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

[00033] *- Note that the FGF21 wild-type sequence in this table refers to NCBI reference sequence number NP_061986.1 (SEQ ID NO:1) unless otherwise specified. All mutations in the FGF21 moiety and corresponding amino acid numbering of said mutations refers back to (SEQ ID NO:1) not to the full-length sequences in this table which may also include Fc and linker regions.

[00034] The variants or mutants used in the fusion proteins of the invention, e.g., variants of wild-type FGF21, feature at least one substituted, added, and/or removed amino acid relative to the wild-type protein. Additionally, the variants may include N- and/or C-terminal truncations relative to the wild-type proteins. Generally speaking, a variant possesses some modified property, structural or functional, of the wild-type protein. For example, the variant may have enhanced or improved physical stability in concentrated solutions (e.g., less hydrophobic mediated aggregation), enhanced or improved plasma stability when incubated with blood plasma or enhanced or improved bioactivity while maintaining a favorable bioactivity profile.

[00035] Acceptable amino acid substitutions and modifications which constitute differences between the portions of the fusion proteins of the invention and their wild-type comparator proteins include, but are not limited to, one or more amino acid substitutions, including substitutions with non-naturally occurring amino acid analogs, and truncations. Thus, the fusion proteins of the invention (e.g., the fusion proteins of the invention) include, but are not limited to, site-directed mutants, truncated polypeptides, proteolysis-resistant mutants, aggregation-reducing mutants, combination mutants, and fusion proteins, as described herein.

[00036] One skilled in the art of expression of proteins will recognize that methionine or methionine-arginine sequence can be introduced at the N-terminus of any of the fusion proteins of the invention, for expression in *E. coli*, and are contemplated within the context of this invention.

[00037] The fusion proteins of the invention may possess increased compatibility with pharmaceutical preservatives (e.g., m-cresol, phenol, benzyl alcohol), thus enabling the preparation of a preserved pharmaceutical formulation that maintains the physiochemical properties and biological activity of the protein during storage. Accordingly, variants with enhanced pharmaceutical stability relative to wild-type, have improved physical stability in concentrated solutions under both physiological and preserved pharmaceutical formulation conditions, while maintaining biological potency. By way of non-limiting example, the fusion proteins of the invention may be more resistant to proteolysis and enzymatic degradation; may have improved stability; and may be less likely to aggregate, than their wild-type counterparts or corresponding native sequence. As used herein, these terms are not mutually exclusive or limiting, it being entirely possible that a given variant has one or more modified properties of the wild-type protein.

[00038] The invention also encompasses nucleic acid molecules encoding the fusion proteins of the invention, comprising, for example, an FGF21 amino acid sequence that is at least about 95% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:3, but wherein specific residues conferring a desirable property to the FGF21 protein variant, e.g.,
5 improved potency to FGF21-receptors, proteolysis-resistance, increased half life or aggregation-reducing properties and combinations thereof have not been further modified. In other words, with the exception of residues in the FGF21 mutant sequence that have been modified in order to confer proteolysis-resistance, aggregation-reducing, or other properties, about 5% (alternately 4%, alternately 3%, alternately 2%, alternately
10 1%) of all other amino acid residues in the FGF21 mutant sequence can be modified. Such FGF21 mutants possess at least one activity of the wild-type FGF21 polypeptide.

[00039] The invention also encompasses a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that is at least about 85%, identical, and more preferably, at least about 90 to 95% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4,
15 but wherein the nucleotides encoding amino acid residues conferring the encoded protein's proteolysis-resistance, aggregation-reducing or other properties have not been further modified. In other words, with the exception of nucleotides that encode residues in the FGF21 mutant sequences that have been modified in order to confer proteolysis-resistance, aggregation-reducing, or other properties, about 15%, and more preferably
20 about 10 to 5% of all other nucleotides in the mutant sequence can be modified. Such nucleic acid molecules encode proteins possessing at least one activity of their wild-type counterparts.

[00040] Provided herein are methods used to generate the fusion proteins of the invention, wherein such methods involve site-specific modification and non-site-specific
25 modification of the wild-type versions of the proteins (e.g., the FGF21 wild-type protein as described herein), e.g., truncations of the wild-type proteins, and the site-specific incorporation of amino acids at positions of interest within the wild-type proteins. Said modifications enhance the biological properties of the fusion proteins of the invention relative to the wild-type proteins, as well as, in some cases, serving as points of
30 attachment for, e.g., labels and protein half-life extension agents, and for purposes of affixing said variants to the surface of a solid support. Related embodiments of the invention are methods of producing cells capable of producing said Fusion Proteins of the invention, and of producing vectors containing DNA encoding said variants.

[00041] In certain embodiments, such modifications, e.g., site-specific modifications,
35 are used to attach conjugates, e.g., PEG groups to proteins, polypeptides, and/or peptides of the invention, for purposes of, e.g., extending half-life or otherwise improving

the biological properties of said proteins, polypeptides, and/or peptides. Said techniques are described further herein.

[00042] In other embodiments, such modifications, e.g., site-specific modifications, are used to attach other polymers, small molecules and recombinant protein sequences that extend half-life of the protein of the invention. One such embodiment includes the attachment of fatty acids or specific albumin binding compounds to proteins, polypeptides, and/or peptides. In other embodiments, the modifications are made at a particular amino acid type and may be attached at one or more sites on the protein.

[00043] In other embodiments, such modifications, e.g., site-specific modifications, are used as means of attachment for the production of wild-type and/or variant multimers, e.g., dimers (homodimers or heterodimers) or trimers or tetramers. These multimeric protein molecules may additionally have groups such as PEG, sugars, and/or PEG-cholesterol conjugates attached or be fused either amino-terminally or carboxy-terminally to other proteins such as Fc, Human Serum Albumin (HSA), etc.

[00044] In other embodiments, such site-specific modifications are used to produce proteins, polypeptides and/or peptides wherein the position of the site-specifically incorporated pyrrolysine or pyrrolysine analogue or non-naturally occurring amino acids (para-acetyl-Phe, para-azido-Phe) allows for controlled orientation and attachment of such proteins, polypeptides and/or peptides onto a surface of a solid support or to have groups such as PEG, sugars and/or PEG-cholesterol conjugates attached.

[00045] In other embodiments, such site-specific modifications are used to site-specifically cross-link proteins, polypeptides and/or peptides thereby forming hetero-oligomers including, but not limited to, heterodimers and heterotrimers. In other embodiments, such site-specific modifications are used to site-specifically cross-link proteins, polypeptides and/or peptides thereby forming protein-protein conjugates, protein-polypeptide conjugates, protein-peptide conjugates, polypeptide-polypeptide conjugates, polypeptide-peptide conjugates or peptide-peptide conjugates. In other embodiments, a site specific modification may include a branching point to allow more than one type of molecule to be attached at a single site of a protein, polypeptide or peptide.

[00046] In other embodiments, the modifications listed herein can be done in a non-site-specific manner and result in protein-protein conjugates, protein-polypeptide conjugates, protein-peptide conjugates, polypeptide-polypeptide conjugates, polypeptide-peptide conjugates or peptide-peptide conjugates of the invention.

Definitions

[00047] Various definitions are used throughout this document. Most words have the meaning that would be attributed to those words by one skilled in the art. Words specifically defined either below or elsewhere in this document have the meaning provided in the context of the present invention as a whole and as are typically understood by those skilled in the art.

[00048] As used herein, the term "FGF21" refers to a member of the fibroblast growth factor (FGF) protein family. An amino acid sequence of FGF21 (GenBank Accession No. NP_061986.1) is set forth as SEQ ID NO:1, the corresponding polynucleotide sequence of which is set forth as SEQ ID NO:2 (NCBI reference sequence number NM_019113.2). "FGF21 variant," "FGF21 mutant," and similar terms describe modified version of the FGF21 protein, e.g., with constituent amino acid residues deleted, added, modified, or substituted.

[00049] As used herein, the term "FGF21 receptor" refers to a receptor for FGF21 (Kharitonov, A, et al. (2008) Journal of Cellular Physiology 215:1-7; Kurosu, H et al. (2007) JBC 282:26687-26695; Ogawa, Y et al. (2007) PNAS 104:7432-7437).

[00050] The term "FGF21 polypeptide" refers to a naturally-occurring polypeptide expressed in humans. For purposes of this disclosure, the term "FGF21 polypeptide" can be used interchangeably to refer to any full-length FGF21 polypeptide, e.g., SEQ ID NO:1, which consists of 209 amino acid residues and which is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2; any mature form of the polypeptide, which consists of 181 amino acid residues, and in which the 28 amino acid residues at the amino-terminal end of the full-length FGF21 polypeptide (i.e., which constitute the signal peptide) have been removed.

[00051] "Variant 76," as used herein, is an FGF21 protein variant, featuring a 40 kDa branched PEG linked through Cys154, and eight point mutations relative to the 177 amino acid wild-type protein. Synthesis of the variant is described in greater detail herein, and the protein sequence is represented in Table 1 and SEQ ID NO:9.

[00052] The term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of proteins, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when total nucleic acid is isolated from the source cells, (2) is not linked to all or a portion of a polynucleotide to which the "isolated nucleic acid molecule" is linked in nature, (3) is operably linked to a polynucleotide which it is not linked to in nature, or (4) does not occur in nature as part of a larger polynucleotide sequence. Preferably, the isolated nucleic acid molecule of the present invention is substantially free from any other contaminating nucleic acid molecules or other contaminants that are found in its natural

environment that would interfere with its use in polypeptide production or its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

[00053] The term “vector” is used to refer to any molecule (e.g., nucleic acid, plasmid, or virus) used to transfer coding information to a host cell.

5 **[00054]** The term “expression vector” refers to a vector that is suitable for transformation of a host cell and contains nucleic acid sequences that direct and/or control the expression of inserted heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

10 **[00055]** The term “operably linked” is used herein to refer to an arrangement of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Elements of fusion proteins may be operably linked to one another so as to allow the fusion protein to function as if it were a naturally occurring, endogenous protein, and/or to combine disparate elements of said
15 fusion proteins in a synergistic fashion.

[00056] On a nucleotide level, a flanking sequence operably linked to a coding sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A
20 flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered “operably linked” to the coding sequence.

[00057] The term “host cell” is used to refer to a cell which has been transformed, or
25 is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

[00058] The term “amino acid,” as used herein, refers to naturally occurring amino
30 acids, unnatural amino acids, amino acid analogues and amino acid mimetics that function in a manner similar to the naturally occurring amino acids, all in their D and L stereoisomers if their structure allows such stereoisomeric forms. Amino acids are referred to herein by either their name, their commonly known three letter symbols or by the one-letter symbols recommended by the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature
35 Commission.

[00059] The term “naturally occurring” when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to

materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, “non-naturally occurring” as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man. When used in connection with nucleotides, the term “naturally occurring” refers to the bases adenine (A), cytosine (C),
5 guanine (G), thymine (T), and uracil (U). When used in connection with amino acids, the term “naturally occurring” refers to the 20 conventional amino acids (i.e., alanine (A), cysteine (C), aspartic acid (D), glutamic acid (E), phenylalanine (F), glycine (G), histidine (H), isoleucine (I), lysine (K), leucine (L), methionine (M), asparagine (N), proline (P), glutamine (Q), arginine (R), serine (S), threonine (T), valine (V), tryptophan (W), and
10 tyrosine (Y)), as well as selenocysteine, pyrrolysine (Pyl, or O), and pyrroline-carboxy-lysine (Pcl, or Z).

[00060] Pyrrolysine (Pyl) is an amino acid naturally found within methylamine methyltransferases of methanogenic archaea of the family *Methanosarcina*. Pyrrolysine is a lysine analogue co-translationally incorporated at in-frame UAG codons in the
15 respective mRNA, and it is considered the 22nd natural amino acid.

[00061] As described at least in PCT patent publication WO2010/48582 (applicant IRM, LLC), attempts to biosynthesize pyrrolysine (Pyl) in *E. coli* resulted in the formation of a “demethylated pyrrolysine,” referred to herein as pyrroline-carboxy-lysine, or Pcl. “Pcl,” as used herein, refers to either Pcl-A or Pcl-B.

20 **[00062]** The terms “non-natural amino acid” and “unnatural amino acid,” as used herein, are interchangeably intended to represent amino acid structures that cannot be generated biosynthetically in any organism using unmodified or modified genes from any organism, whether the same or different. The terms refer to an amino acid residue that is not present in the naturally occurring (wild-type) FGF21 protein sequence or the
25 sequences of the present invention. These include, but are not limited to, modified amino acids and/or amino acid analogues that are not one of the 20 naturally occurring amino acids, selenocysteine, pyrrolysine (Pyl), or pyrroline-carboxy-lysine (Pcl, e.g., as described in PCT patent publication WO2010/48582). Such non-natural amino acid residues can be introduced by substitution of naturally occurring amino acids, and/or by
30 insertion of non-natural amino acids into the naturally occurring (wild-type) FGF21 protein sequence or the sequences of the invention. The non-natural amino acid residue also can be incorporated such that a desired functionality is imparted to the FGF21 molecule, for example, the ability to link a functional moiety (e.g., PEG). When used in connection with amino acids, the symbol “U” shall mean “non-natural amino
35 acid” and “unnatural amino acid,” as used herein.

[00063] In addition, it is understood that such “unnatural amino acids” require a modified tRNA and a modified tRNA synthetase (RS) for incorporation into a protein.

These “selected” orthogonal tRNA/RS pairs are generated by a selection process as developed by Schultz et al. or by random or targeted mutation. As way of example, pyrroline-carboxy-lysine is a “natural amino acid” as it is generated biosynthetically by genes transferred from one organism into the host cells and as it is incorporated into proteins by using natural tRNA and tRNA synthetase genes, while *p*-aminophenylalanine (See, Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9) is an “unnatural amino acid” because, although generated biosynthetically, it is incorporated into proteins by a “selected” orthogonal tRNA/tRNA synthetase pair.

[00064] Modified encoded amino acids include, but are not limited to, hydroxyproline, γ -carboxyglutamate, O-phosphoserine, azetidinecarboxylic acid, 2-aminoadipic acid, 3-aminoadipic acid, beta-alanine, aminopropionic acid, 2-aminobutyric acid, 4-aminobutyric acid, 6-aminocaproic acid, 2-aminoheptanoic acid, 2-aminoisobutyric acid, 3-aminoisobutyric acid, 2-aminopimelic acid, tertiary-butylglycine, 2,4-diaminoisobutyric acid, desmosine, 2,2'-diaminopimelic acid, 2,3-diaminopropionic acid, N-ethylglycine, N-methylglycine, N-ethylasparagine, homoproline, hydroxylysine, allo-hydroxylysine, 3-hydroxyproline, 4-hydroxyproline, isodesmosine, allo-isoleucine, N-methylalanine, N-methylglycine, N-methylisoleucine, N-methylpentylglycine, N-methylvaline, naphthalanine, norvaline, norleucine, ornithine, pentylglycine, pipercolic acid and thioproline. The term “amino acid” also includes naturally occurring amino acids that are metabolites in certain organisms but are not encoded by the genetic code for incorporation into proteins. Such amino acids include, but are not limited to, ornithine, D-ornithine, and D-arginine.

[00065] The term “amino acid analogue,” as used herein, refers to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, by way of example only, an α -carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group. Amino acid analogues include the natural and unnatural amino acids which are chemically blocked, reversibly or irreversibly, or their C-terminal carboxy group, their N-terminal amino group and/or their side-chain functional groups are chemically modified. Such analogues include, but are not limited to, methionine sulfoxide, methionine sulfone, S-(carboxymethyl)-cysteine, S-(carboxymethyl)-cysteine sulfoxide, S-(carboxymethyl)-cysteine sulfone, aspartic acid-(beta-methyl ester), N-ethylglycine, alanine carboxamide, homoserine, norleucine, and methionine methyl sulfonium.

[00066] The term “amino acid mimetics,” as used herein, refers to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid, but functions in a manner similar to a naturally occurring amino acid.

[00067] The term “biologically active variant” refers to any polypeptide variant used in the fusion proteins of the invention, e.g., as a constituent protein of the fusions, that possesses an activity of its wild-type (e.g., naturally-occurring) protein or polypeptide counterpart, such as the ability to modulate blood glucose, HbA1c, insulin, triglyceride, or cholesterol levels; increase pancreatic function; reduce lipid levels in liver; reduce body weight; and to improve glucose tolerance, energy expenditure, or insulin sensitivity, regardless of the type or number of modifications that have been introduced into the polypeptide variant. Polypeptide variants possessing a somewhat decreased level of activity relative to their wild-type versions can nonetheless be considered to be biologically active polypeptide variants. A non-limiting representative example of a biologically active polypeptide variant of the invention is an FGF21 variant, which is modified after, and possesses similar or enhanced biological properties relative to, wild-type FGF21.

[00068] The terms “effective amount” and “therapeutically effective amount” each refer to the amount of a fusion protein of the invention used to support an observable level of one or more biological activities of the wild-type polypeptide or protein counterparts, such as the ability to lower blood glucose, insulin, triglyceride or cholesterol levels; reduce liver triglyceride or lipid levels; reduce body weight; or improve glucose tolerance, energy expenditure, or insulin sensitivity. For example, a “therapeutically-effective amount” administered to a patient exhibiting, suffering, or prone to suffer from FGF21-associated disorders (such as type 1 or type 2 diabetes mellitus, obesity, or metabolic syndrome), is such an amount which induces, ameliorates or otherwise causes an improvement in the pathological symptoms, disease progression, physiological conditions associated with or resistance to succumbing to the afore mentioned disorders. For the purposes of the present invention a “subject” or “patient” is preferably a human, but can also be an animal, more specifically, a companion animal (e.g., dogs, cats, and the like), farm animals (e.g., cows, sheep, pigs, horses, and the like) and laboratory animals (e.g., rats, mice, guinea pigs, and the like).

[00069] The term “pharmaceutically acceptable carrier” or “physiologically acceptable carrier” as used herein refers to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of a fusion protein of the invention.

[00070] The term “antigen” refers to a molecule or a portion of a molecule that is capable of being bound by an antibody, and additionally that is capable of being used in

an animal to produce antibodies that are capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more epitopes.

[00071] The term “native Fc” refers to molecule or sequence comprising the sequence of a non-antigen-binding fragment resulting from digestion of whole antibody or produced by other means, whether in monomeric or multimeric form, and can contain the hinge region. The original immunoglobulin source of the native Fc is preferably of human origin and can be any of the immunoglobulins, although IgG1 and IgG2 are preferred. Native Fc molecules are made up of monomeric polypeptides that can be linked into dimeric or multimeric forms by covalent (i.e., disulfide bonds) and non-covalent association. The number of intermolecular disulfide bonds between monomeric subunits of native Fc molecules ranges from 1 to 4 depending on class (e.g., IgG, IgA, and IgE) or subclass (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, and IgGA2). One example of a native Fc is a disulfide-bonded dimer resulting from papain digestion of an IgG (see Ellison et al., 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). The term “native Fc” as used herein is generic to the monomeric, dimeric, and multimeric forms.

[00072] The term “Fc variant” refers to a molecule or sequence that is modified from a native Fc but still comprises a binding site for the salvage receptor, FcRn (neonatal Fc receptor). International Publication Nos. WO 97/34631 and WO 96/32478 describe exemplary Fc variants, as well as interaction with the salvage receptor, and are hereby incorporated by reference. Thus, the term “Fc variant” can comprise a molecule or sequence that is humanized from a non-human native Fc. Furthermore, a native Fc comprises regions that can be removed because they provide structural features or biological activity that are not required for the fusion molecules of the fusion proteins of the invention. Thus, the term “Fc variant” comprises a molecule or sequence that lacks one or more native Fc sites or residues, or in which one or more Fc sites or residues has been modified, that affect or are involved in: (1) disulfide bond formation, (2) incompatibility with a selected host cell, (3) N-terminal heterogeneity upon expression in a selected host cell, (4) glycosylation, (5) interaction with complement, (6) binding to an Fc receptor other than a salvage receptor, or (7) antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Fc variants are described in further detail hereinafter.

[00073] The term “Fc domain” encompasses native Fc and Fc variants and sequences as defined above. As with Fc variants and native Fc molecules, the term “Fc domain” includes molecules in monomeric or multimeric form, whether digested from whole antibody or produced by other means. In some embodiments of the present invention, an Fc domain can be fused to FGF21 or a FGF21 mutant (including a truncated form of FGF21 or a FGF21 mutant) via, for example, a covalent bond between the Fc domain and the FGF21 sequence. Such fusion proteins can form multimers via

the association of the Fc domains and both these fusion proteins and their multimers are an aspect of the present invention.

[00074] The term "modified Fc fragment", as used herein, shall mean an Fc fragment of an antibody comprising a modified sequence. The Fc fragment is a portion of an antibody comprising the CH₂, CH₃ and part of the hinge region. The modified Fc fragment can be derived from, for example, IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4. FcLALA is a modified Fc fragment with a LALA mutation (L234A, L235A), which triggers ADCC with lowered efficiency, and binds and activates human complement weakly. Hessel et al. 2007 Nature 449:101-104. Additional modifications to the Fc fragment are described in, for example, U.S. Patent No. 7,217,798.

[00075] The term "heterologous" means that these domains are not naturally found associated with constant regions of an antibody. In particular, such heterologous binding domains do not have the typical structure of an antibody variable domain consisting of 4 framework regions, FR1, FR2, FR3 and FR4 and the 3 complementarity determining regions (CDRs) in-between. Each arm of the fusobody therefore comprises a first single chain polypeptides comprising a first binding domain covalently linked at the N-terminal part of a constant C_H1 heavy chain region of an antibody, and a second single chain polypeptide comprising a second binding domain covalently linked at the N-terminal part of a constant C_L light chain of an antibody. The covalent linkage may be direct, for example via peptidic bound or indirect, via a linker, for example a peptidic linker. The two heterodimers of the fusobody are covalently linked, for example, by at least one disulfide bridge at their hinge region, like an antibody structure. Examples of molecules with a fusobody structure have been described in the art, in particular, fusobodies comprising ligand binding region of heterodimeric receptor (see for example international patent publications WO01/46261 and WO11/076781).

[00076] The term "polyethylene glycol" or "PEG" refers to a polyalkylene glycol compound or a derivative thereof, with or without coupling agents or derivatization with coupling or activating moieties.

[00077] The term "FGF21-associated disorders," and terms similarly used herein, includes obesity, type 1 and type 2 diabetes mellitus, pancreatitis, dyslipidemia, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), nonalcoholic steatohepatitis (NASH), insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose intolerance, hyperglycemia, metabolic syndrome, acute myocardial infarction, hypertension, cardiovascular disease, atherosclerosis, peripheral arterial disease, stroke, heart failure, coronary heart disease, kidney disease, diabetic complications, neuropathy, gastroparesis, disorders associated with severe inactivating mutations in the insulin receptor, and other metabolic disorders.

- [00078]** The term “disorders associated with severe inactivating mutations in the insulin receptor,” and terms similarly used herein, describe conditions in subjects afflicted with mutations in the insulin receptor (or possible proteins directly downstream from it) which cause severe insulin resistance but are often (though not always) seen without the obesity common in Type 2 diabetes mellitus. In many ways, subjects afflicted with these conditions manifest hybrid symptoms of Type 1 diabetes mellitus and Type 2 diabetes mellitus. Subjects thereby afflicted fall into several categories of roughly increasing severity, including: Type A Insulin Resistance, Type C Insulin Resistance (AKA HAIR-AN Syndrome), Rabson-Mendenhall Syndrome and finally Donohue’s Syndrome or Leprechaunism. These disorders are associated with very high endogenous insulin levels, and very often, hyperglycemia. Subjects thereby afflicted also present with various clinical features associated with “insulin toxicity,” including hyperandrogenism, polycystic ovarian syndrome (PCOS), hirsutism, and acanthosis nigricans (excessive growth and pigmentation) in the folds of the skin.
- [00079]** “Type 2 diabetes mellitus” is a condition characterized by excess glucose production in spite of the availability of insulin, and circulating glucose levels remain excessively high as a result of inadequate glucose clearance.
- [00080]** “Type 1 diabetes mellitus” is a condition characterized by high blood glucose levels caused by total lack of insulin. This occurs when the body’s immune system attacks the insulin-producing beta cells in the pancreas and destroys them. The pancreas then produces little or no insulin.
- [00081]** “Glucose intolerance” or Impaired Glucose Tolerance (IGT) is a pre-diabetic state of dysglycemia that is associated with increased risk of cardiovascular pathology. The pre-diabetic condition prevents a subject from moving glucose into cells efficiently and utilizing it as an efficient fuel source, leading to elevated glucose levels in blood and some degree of insulin resistance.
- [00082]** “Hyperglycemia” is defined as an excess of sugar (glucose) in the blood.
- [00083]** “Hypoglycemia”, also called low blood sugar, occurs when your blood glucose level drops too low to provide enough energy for your body’s activities.
- [00084]** “Hyperinsulinemia” is defined as a higher-than-normal level of insulin in the blood.
- [00085]** “Insulin resistance” is defined as a state in which a normal amount of insulin produces a subnormal biologic response.
- [00086]** “Obesity,” in terms of the human subject, can be defined as that body weight over 20 percent above the ideal body weight for a given population (R. H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, p. 904-916).

[00087] “Diabetic complications” are problems, caused by high blood glucose levels, with other body functions such as kidneys, nerves (neuropathies), feet (foot ulcers and poor circulation) and eyes (e.g. retinopathies). Diabetes also increases the risk for heart disease and bone and joint disorders. Other long-term complications of diabetes include skin problems, digestive problems, sexual dysfunction and problems with teeth and gums.

[00088] “Metabolic syndrome” can be defined as a cluster of at least three of the following signs: abdominal fat--in most men, a 40-inch waist or greater; high blood sugar--at least 110 milligrams per deciliter (mg/dl) after fasting; high triglycerides--at least 150 mg/dL in the bloodstream; low HDL--less than 40 mg/dl; and, blood pressure of 130/85 mmHg or higher.

[00089] “Pancreatitis” is inflammation of the pancreas.

[00090] “Dyslipidemia” is a disorder of lipoprotein metabolism, including lipoprotein overproduction or deficiency. Dyslipidemias may be manifested by elevation of the total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and triglyceride concentrations, and a decrease in high-density lipoprotein (HDL) cholesterol concentration in the blood.

[00091] “Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)” is a liver disease, not associated with alcohol consumption, characterized by fatty change of hepatocytes.

[00092] “Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)” is a liver disease, not associated with alcohol consumption, characterized by fatty change of hepatocytes, accompanied by intralobular inflammation and fibrosis.

[00093] “Hypertension” or high blood pressure that is a transitory or sustained elevation of systemic arterial blood pressure to a level likely to induce cardiovascular damage or other adverse consequences. Hypertension has been arbitrarily defined as a systolic blood pressure above 140 mmHg or a diastolic blood pressure above 90 mmHg.

[00094] “Cardiovascular diseases” are diseases related to the heart or blood vessels.

[00095] “Acute myocardial infarction” occurs when there is interruption of the blood supply to a part of the heart. The resulting ischemia and oxygen shortage, if left untreated for a sufficient period of time, can cause damage or death (infarction) of the heart muscle tissue (myocardium).

[00096] “Peripheral arterial disease” occurs when plaque builds up in the arteries that carry blood to the head, organs and limbs. Over time, plaque can harden and narrow the arteries which limits the flow of oxygen-rich blood to organs and other parts of the the body.

[00097] “Atherosclerosis” is a vascular disease characterized by irregularly distributed lipid deposits in the intima of large and medium-sized arteries, causing narrowing of arterial lumens and proceeding eventually to fibrosis and calcification.

Lesions are usually focal and progress slowly and intermittently. Limitation of blood flow accounts for most clinical manifestations, which vary with the distribution and severity of lesions.

[00098] “Stroke” is any acute clinical event, related to impairment of cerebral

5 circulation, that lasts longer than 24 hours. A stroke involves irreversible brain damage, the type and severity of symptoms depending on the location and extent of brain tissue whose circulation has been compromised.

[00099] “Heart failure”, also called congestive heart failure, is a condition in which the heart can no longer pump enough blood to the rest of the body.

10 **[000100]** “Coronary heart disease”, also called coronary artery disease, is a narrowing of the small blood vessels that supply blood and oxygen to the heart.

[000101] “Kidney disease” or nephropathy is any disease of the kidney. Diabetic nephropathy is a major cause of morbidity and mortality in people with type 1 or type 2 diabetes mellitus.

15 **[000102]** “Neuropathies” are any diseases involving the cranial nerves or the peripheral or autonomic nervous system.

[000103] “Gastroparesis” is weakness of gastric peristalsis, which results in delayed emptying of the bowels.

[000104] The critically ill patients encompassed by the present invention generally
20 experience an unstable hypermetabolic state. This unstable metabolic state is due to changes in substrate metabolism, which may lead to relative deficiencies in some nutrients. Generally there is an increased oxidation of both fat and muscle.

[000105] Moreover, critically ill patients are preferably patients that experience systemic inflammatory response syndrome or respiratory distress. A reduction in
25 morbidity means reducing the likelihood that a critically ill patient will develop additional illnesses, conditions, or symptoms or reducing the severity of additional illnesses, conditions, or symptoms. For example reducing morbidity may correspond to a decrease in the incidence of bacteremia or sepsis or complications associated with multiple organ failure.

30 **[000106]** As used herein, the singular forms “a,” “an” and “the” include plural references unless the content clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to “an antibody” includes a mixture of two or more such antibodies.

[000107] As used herein, the term “about” refers to +/- 20%, more preferably, +/- 10%, or still more preferably, +/- 5% of a value.

35 **[000108]** The terms “polypeptide” and “protein”, are used interchangeably and refer to a polymeric form of amino acids of any length, which can include coded and non-coded amino acids, naturally and non-naturally occurring amino acids, chemically or

biochemically modified or derivatized amino acids, and polypeptides having modified peptide backbones. The term includes fusion proteins, including, but not limited to, fusion proteins with a heterologous amino acid sequence, fusions with heterologous and homologous leader sequences, with or without N-terminal methionine residues;

5 immunologically tagged proteins; and the like.

[000109] The terms “individual”, “subject”, “host” and “patient” are used interchangeably and refer to any subject for whom diagnosis, treatment, or therapy is desired, particularly humans. Other subjects may include cattle, dogs, cats, guinea pigs, rabbits, rats, mice, horses, and the like. In some preferred embodiments the
10 subject is a human.

[000110] As used herein, the term “sample” refers to biological material from a patient. The sample assayed by the present invention is not limited to any particular type. Samples include, as non-limiting examples, single cells, multiple cells, tissues, tumors, biological fluids, biological molecules, or supernatants or extracts of any of the
15 foregoing. Examples include tissue removed for biopsy, tissue removed during resection, blood, urine, lymph tissue, lymph fluid, cerebrospinal fluid, mucous, and stool samples. The sample used will vary based on the assay format, the detection method and the nature of the tumors, tissues, cells or extracts to be assayed. Methods for preparing samples are well known in the art and can be readily adapted in order to
20 obtain a sample that is compatible with the method utilized.

[000111] As used herein, the term “biological molecule” includes, but is not limited to, polypeptides, nucleic acids, and saccharides.

[000112] As used herein, the term “modulating” refers to a change in the quality or quantity of a gene, protein, or any molecule that is inside, outside, or on the surface of a
25 cell. The change can be an increase or decrease in expression or level of the molecule. The term “modulates” also includes changing the quality or quantity of a biological function/activity including, without limitation, the ability to lower blood glucose, insulin, triglyceride, or cholesterol levels; to reduce liver lipid or liver triglyceride levels; to reduce body weight; and to improve glucose tolerance, energy expenditure, or insulin
30 sensitivity.

[000113] As used herein, the term “modulator” refers to a composition that modulates one or more physiological or biochemical events associated with an FGF21-associated disorder, such as type 1 or type 2 diabetes mellitus or a metabolic condition like obesity. Said events include but are not limited to the ability to lower blood glucose, insulin,
35 triglyceride, or cholesterol levels; to reduce liver lipid or liver triglyceride levels; to reduce body weight; and to improve glucose tolerance, energy expenditure, or insulin sensitivity.

[000114] A “gene product” is a biopolymeric product that is expressed or produced by a gene. A gene product may be, for example, an unspliced RNA, an mRNA, a splice variant mRNA, a polypeptide, a post-translationally modified polypeptide, a splice variant polypeptide etc. Also encompassed by this term are biopolymeric products that are made using an RNA gene product as a template (i.e. cDNA of the RNA). A gene product may be made enzymatically, recombinantly, chemically, or within a cell to which the gene is native. In some embodiments, if the gene product is proteinaceous, it exhibits a biological activity. In some embodiments, if the gene product is a nucleic acid, it can be translated into a proteinaceous gene product that exhibits a biological activity.

[000115] “Modulation of FGF21 activity,” as used herein, refers to an increase or decrease in FGF21 activity that can be a result of, for example, interaction of an agent with an FGF21 polynucleotide or polypeptide, inhibition of FGF21 transcription and/or translation (e.g., through antisense or siRNA interaction with the FGF21 gene or FGF21 transcript, through modulation of transcription factors that facilitate FGF21 expression), and the like. For example, modulation of a biological activity refers to an increase or a decrease in a biological activity. FGF21 activity can be assessed by means including, without limitation, assaying blood glucose, insulin, triglyceride, or cholesterol levels in a subject, assessing FGF21 polypeptide levels, or by assessing FGF21 transcription levels. Comparisons of FGF21 activity can also be accomplished by, e.g., measuring levels of an FGF21 downstream biomarker, and measuring increases in FGF21 signaling. FGF21 activity can also be assessed by measuring: cell signaling; kinase activity; glucose uptake into adipocytes; blood insulin, triglyceride, or cholesterol level fluctuations; liver lipid or liver triglyceride level changes; interactions between FGF21 and an FGF21 receptor; or phosphorylation of an FGF21 receptor. In some embodiments phosphorylation of an FGF21 receptor can be tyrosine phosphorylation. In some embodiments modulation of FGF21 activity can cause modulation of an FGF21-related phenotype.

[000116] Comparisons of FGF21 activity can also be accomplished by, e.g., measuring levels of an FGF21 downstream biomarker, and measuring increases in FGF21 signaling. FGF21 activity can also be assessed by measuring: cell signaling; kinase activity; glucose uptake into adipocytes; blood insulin, triglyceride, or cholesterol level fluctuations; liver lipid or liver triglyceride level changes; interactions between FGF21 and a receptor (FGFR-1c, FGFR-2c, or FGFR-3c); or phosphorylation of an FGF21 receptor. In some embodiments phosphorylation of an FGF21 receptor can be tyrosine phosphorylation. In some embodiments modulation of FGF21 activity can cause modulation of an FGF21-related phenotype.

[000117] A “FGF21 downstream biomarker,” as used herein, is a gene or gene product, or measurable indicia of a gene or gene product. In some embodiments, a gene or activity that is a downstream marker of FGF21 exhibits an altered level of expression, or in a vascular tissue. In some embodiments, an activity of the downstream marker is altered in the presence of an FGF21 modulator. In some embodiments, the downstream markers exhibit altered levels of expression when FGF21 is perturbed with an FGF21 modulator of the present invention. FGF21 downstream markers include, without limitation, glucose or 2-deoxy-glucose uptake, pERK and other phosphorylated or acetylated proteins or NAD levels.

[000118] As used herein, the term “up-regulates” refers to an increase, activation or stimulation of an activity or quantity. For example, in the context of the present invention, FGF21 modulators may increase the activity of an FGF21 receptor. In one embodiment, one or more FGFR-1c, FGFR-2c, or FGFR-3c may be upregulated in response to an FGF21 modulator. Upregulation can also refer to an FGF21-related activity, such as e.g., the ability to lower blood glucose, insulin, triglyceride, or cholesterol levels; to reduce liver lipid or triglyceride levels; to reduce body weight; to improve glucose tolerance, energy expenditure, or insulin sensitivity; or to cause phosphorylation of an FGF21 receptor; or to increase an FGF21 downstream marker. The FGFR21 receptor can be one or more of FGFR-1c, FGFR-2c, or FGFR-3c. Up-regulation may be at least 25%, at least 50%, at least 75%, at least 100%, at least 150%, at least 200%, at least 250%, at least 400%, or at least 500% as compared to a control.

[000119] As used herein, the term “N-terminus” refers to at least the first 20 amino acids of a protein.

[000120] As used herein, the terms “N-terminal domain” and “N-terminal region” are used interchangeably and refer to a fragment of a protein that begins at the first amino acid of the protein and ends at any amino acid in the N-terminal half of the protein. For example, the N-terminal domain of FGF21 is from amino acid 1 of SEQ ID NO:1 to any amino acid between about amino acids 10 and 105 of SEQ ID NO:1.

[000121] As used herein, the term “C-terminus” refers to at least the last 20 amino acids of a protein.

[000122] As used herein, the terms “C-terminal domain” and “C-terminal region” are used interchangeably and refer to a fragment of a protein that begins at any amino acid in the C-terminal half of the protein and ends at the last amino acid of the protein. For example, the C-terminal domain of FGF21 begins at any amino acid from amino acid 105 to about amino acid 200 of SEQ ID NO:1 and ends at amino acid 209 of SEQ ID NO:1.

[000123] The term “domain” as used herein refers to a structural part of a biomolecule that contributes to a known or suspected function of the biomolecule. Domains may be co-extensive with regions or portions thereof and may also incorporate a portion of a biomolecule that is distinct from a particular region, in addition to all or part of that

5 region.

[000124] As used herein, the term “signal domain” (also called “signal sequence” or “signal peptide”) refers to a peptide domain that resides in a continuous stretch of amino acid sequence at the N-terminal region of a precursor protein (often a membrane-bound or secreted protein) and is involved in post-translational protein transport. In many cases the signal domain is removed from the full-length protein by specialized signal peptidases after the sorting process has been completed. Each signal domain specifies a particular destination in the cell for the precursor protein. The signal domain of FGF21 is amino acids 1-28 of SEQ ID NO:1.

10

[000125] As used herein, the term “receptor binding domain” refers to any portion or region of a protein that contacts a membrane-bound receptor protein, resulting in a cellular response, such as a signaling event.

15

[000126] As used herein, the term “ligand binding domain” refers to any portion or region of a fusion protein of the invention retaining at least one qualitative binding activity of a corresponding native sequence.

20

[000127] The term “region” refers to a physically contiguous portion of the primary structure of a biomolecule. In the case of proteins, a region is defined by a contiguous portion of the amino acid sequence of that protein. In some embodiments a “region” is associated with a function of the biomolecule.

25

[000128] The term “fragment” as used herein refers to a physically contiguous portion of the primary structure of a biomolecule. In the case of proteins, a portion is defined by a contiguous portion of the amino acid sequence of that protein and refers to at least 3-5 amino acids, at least 8-10 amino acids, at least 11-15 amino acids, at least 17-24 amino acids, at least 25-30 amino acids, and at least 30-45 amino acids. In the case of oligonucleotides, a portion is defined by a contiguous portion of the nucleic acid sequence of that oligonucleotide and refers to at least 9-15 nucleotides, at least 18-30 nucleotides, at least 33-45 nucleotides, at least 48-72 nucleotides, at least 75-90 nucleotides, and at least 90-130 nucleotides. In some embodiments, portions of biomolecules have a biological activity. In the context of the present invention, FGF21 polypeptide fragments do not comprise the entire FGF21 polypeptide sequence set forth in SEQ ID NO:1.

30

35

[000129] A “native sequence” polypeptide is one that has the same amino acid sequence as a polypeptide derived from nature. Such native sequence polypeptides can

be isolated from nature or can be produced by recombinant or synthetic means. Thus, a native sequence polypeptide can have the amino acid sequence of naturally occurring human polypeptide, murine polypeptide, or polypeptide from any other mammalian species.

5 **[000130]** As used herein, the phrase "homologous nucleotide sequence," or "homologous amino acid sequence," or variations thereof, refers to sequences characterized by a homology, at the nucleotide level or amino acid level, of at least a specified percentage and is used interchangeably with "sequence identity." Homologous nucleotide sequences include those sequences coding for isoforms of
10 proteins. Such isoforms can be expressed in different tissues of the same organism as a result of, for example, alternative splicing of RNA. Alternatively, isoforms can be encoded by different genes. Homologous nucleotide sequences include nucleotide sequences encoding for a protein of a species other than humans, including, but not limited to, mammals. Homologous nucleotide sequences also include, but are not
15 limited to, naturally occurring allelic variations and mutations of the nucleotide sequences set forth herein. Homologous amino acid sequences include those amino acid sequences which contain conservative amino acid substitutions and which polypeptides have the same binding and/or activity. In some embodiments, a nucleotide or amino acid sequence is homologous if it has at least 60% or greater, up to
20 99%, identity with a comparator sequence. In some embodiments, a nucleotide or amino acid sequence is homologous if it shares one or more, up to 60, nucleotide/amino acid substitutions, additions, or deletions with a comparator sequence. In some embodiments, the homologous amino acid sequences have no more than 5 or no more than 3 conservative amino acid substitutions.

25 **[000131]** Percent homology or identity can be determined by, for example, the Gap program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI), using default settings, which uses the algorithm of Smith and Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489). In some embodiments, homology between the probe and target is between about 75% to
30 about 85%. In some embodiments, nucleic acids have nucleotides that are at least about 95%, about 97%, about 98%, about 99% and about 100% homologous to SEQ ID NO:2, or a portion thereof.

[000132] Homology may also be at the polypeptide level. In some embodiments, constituent polypeptides of the fusion proteins of the invention may be at least 95%
35 homologous to their full length wild-type counterparts or corresponding native sequences, or to portions thereof. The degree or percentage identity of Fusion Proteins of the invention, or portions thereof, and different amino acid sequences is calculated as

the number of exact matches in an alignment of the two sequences divided by the length of the "invention sequence" or the "foreign sequence", whichever is shortest. The result is expressed as percent identity.

5 **[000133]** As used herein, the term "mixing" refers to the process of combining one or more compounds, cells, molecules, and the like together in the same area. This may be performed, for example, in a test tube, petri dish, or any container that allows the one or more compounds, cells, or molecules, to be mixed.

10 **[000134]** As used herein, the term "substantially purified" refers to a compound (e.g., either a polynucleotide or a polypeptide or an antibody) that is removed from its natural environment and is at least 60% free, at least 75% free, and at least 90% free from other components with which it is naturally associated.

15 **[000135]** The term "pharmaceutically acceptable carrier" refers to a carrier for administration of a therapeutic agent, such as antibodies or a polypeptide, genes, and other therapeutic agents. The term refers to any pharmaceutical carrier that does not itself induce the production of antibodies harmful to the individual receiving the composition, and which can be administered without undue toxicity. Suitable carriers can be large, slowly metabolized macromolecules such as proteins, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, lipid aggregates and inactive virus particles. Such carriers are well known to those of
20 ordinary skill in the art. Pharmaceutically acceptable carriers in therapeutic compositions can include liquids such as water, saline, glycerol and ethanol. Auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, pH buffering substances, and the like, can also be present in such vehicles.

25 **Enhancing the Physical Stability of the Fusion Proteins of the Invention**

30 **[000136]** Naturally occurring disulfide bonds, as provided by cysteine residues, generally increase thermodynamic stability of proteins. Successful examples of increased thermodynamic stability, as measured in increase of the melting temperature, are multiple disulfide-bonded mutants of the enzymes T4 lysozyme (Matsumura et al., PNAS 86:6562-6566 (1989)) and barnase (Johnson et al., J. Mol. Biol. 268:198-208 (1997)). An aspect of the present invention is an enhancement of the physical stability of FGF21 in the presence of a preservative, achieved by the presence of disulfide bonds within the variants, which constrain the flexibility of wild-type FGF21 and thereby limit access of the preservative to the hydrophobic core of the protein.

35 **[000137]** The second aspect of the present invention therefore provides variants of human FGF21, or a biologically active peptide thereof, with enhanced pharmaceutical stability engendered by the incorporation of additional disulfide bonds, e.g., via

incorporating or substituting cysteine residues into the wild-type FGF21 protein or the polypeptide and protein variants of the invention. One skilled in the art will recognize that the native cysteines, cysteine 103 and cysteine 121, could be utilized as loci to introduce a novel disulfide bond that may impart improved properties, in addition to the suggested embodiments described herein.

5 **[000138]** These include fusion proteins which incorporate wild-type FGF-21 with the substitution of a cysteine for two or more of the following: glutamine 46, arginine 47, tyrosine 48, leucine 49, tyrosine 50, threonine 51, aspartate 52, aspartate 53, alanine 54, glutamine 55, glutamine 56, threonine 57, glutamate 58, alanine 59, histidine 60, 10 leucine 61, glutamate 62, isoleucine 63, valine 69, glycine 70, glycine 71, alanine 72, alanine 73, leucine 144, histidine 145, leucine 146, proline 147, glycine 148, asparagine 149, lysine 150, serine 151, proline 152, histidine 153, arginine 154, aspartate 155, proline 156, alanine 157, proline 158, arginine 159, glycine 160, proline 161, alanine 162, arginine 163, phenylalanine 164, wherein the numbering of the amino acids is 15 based on the full length 209 amino acid hFGF21 sequence SEQ ID NO:1

[000139] Furthermore, fusion proteins of the invention may incorporate variants of wild-type human FGF21, or a biologically active peptide thereof, which are enhanced with engineered disulfide bonds, in addition to the naturally occurring one at Cys103-Cys121, are as follows: Gln46Cys-Ala59Cys, Gln46Cys-His60Cys, Gln46Cys- 20 Leu61Cys, Gln46Cys-Glu62Cys, Gln46Cys-Ile63Cys, Arg47Cys-Ala59Cys, Arg47Cys-His60Cys, Arg47Cys-Leu61Cys, Arg47Cys-Glu62Cys, Arg47Cys-Ile63Cys, Tyr48Cys-Ala59Cys, Tyr48Cys-His60Cys, Tyr48Cys-Leu61Cys, Tyr48Cys-Glu62Cys, Tyr48Cys-Ile63Cys, Leu49Cys-Ala59Cys, Leu49Cys-His60Cys, Leu49Cys-Leu61Cys, Leu49Cys-Glu62Cys, Leu49Cys-Ile63Cys, Tyr50Cys-Ala59Cys, Tyr50Cys-His60Cys, Tyr50Cys- 25 Lue61Cys, Tyr50Cys-Glu62Cys, Tyr50Cys-Ile63Cys, Leu144Cys-Gly160Cys, Leu144Cys-Pro161Cys, Leu144Cys-Ala162Cys, Leu144Cys-Arg163Cys, Leu144Cys-Phe164Cys, His145Cys-Gly160Cys, His145Cys-Pro161Cys, His145Cys-Ala162Cys, His145Cys-Arg163Cys, His145Cys-Phe164Cys, Leu146Cys-Gly160Cys, Leu146Cys-Pro161Cys, Leu146Cys-Ala162Cys, Leu146Cys-Arg163Cys, Leu146Cys-Phe164Cys, 30 Pro147Cys-Gly160Cys, Pro147Cys-Pro161Cys, Pro147Cys-Ala162Cys, Pro147Cys-Arg163Cys, Pro147Cys-Phe164Cys, Gly148Cys-Gly160Cys, Gly148Cys-Pro161Cys, Gly148Cys-Ala162Cys, Gly148Cys-Arg163Cys, Gly148Cys-Phe164Cys, Thr57Cys-Val69Cys, Thr57Cys-Gly70Cys, Thr57Cys-Gly71Cys, Thr57Cys-Ala72Cys, Thr57Cys-Ala73Cys, Glu58Cys-Val69Cys, Glu58Cys-Glu70Cys, Glu58Cys-G71Cys, Glu58Cys-Ala72Cys, Glu58Cys-Ala73Cys, Ala59Cys-Val69Cys, Ala59Cys-Gly70Cys, Ala59Cys-Gly71Cys, Ala59Cys-Ala72Cys, Ala59Cys-Ala73Cys, His60Cys-Val69Cys, His60Cys-Gly70Cys, His60Cys-Gly71Cys, His60Cys-Ala72Cys, His60Cys-Ala73Cys, Leu61Cys-

Val69Cys, Leu61Cys-Gly70Cys, Leu61Cys-Gly71Cys, Leu61Cys-Ala72Cys, Leu61Cys-Ala73Cys, Arg47Cys-Gly148Cys, Tyr48Cys-Gly148Cys, Leu49Cys-Gly148Cys, Tyr50Cys-Gly148Cys, Thr51Cys-Gly148Cys, Asp52Cys-Gly148Cys, Asp53Cys-Gly148Cys, Ala54Cys-Gly148Cys, Gln55Cys-Gly148Cys, Gln56Cys-Gly148Cys, Thr57Cys-Gly148Cys, Glu58Cys-Gly148Cys, Arg47Cys-Asn149Cys, Tyr48Cys-Asn149Cys, Leu49Cys-Asn149Cys, Tyr50Cys-Asn149Cys, Thr51Cys-Asn149Cys, Asp52Cys-Asn149Cys, Asp53Cys-Asn149Cys, Ala54Cys-Asn149Cys, Gln55Cys-Asn149Cys, Gln56Cys-Asn149Cys, Thr57Cys-Asn149Cys, Glu58Cys-Asn149Cys, Arg47Cys-Lys150Cys, Tyr48Cys-Lys150Cys, Leu49Cys-Lys150Cys, Tyr50Cys-Lys150Cys, Thr51Cys-Lys150Cys, Asp52Cys-Lys150Cys, Asp53Cys-Lys150Cys, Ala54Cys-Lys150Cys, Gln55Cys-Lys150Cys, Gln56Cys-Lys150Cys, Thr57Cys-Lys150Cys, Glu58Cys-Lys150Cys, Arg47Cys-Ser151Cys, Tyr48Cys-Ser151Cys, Leu49Cys-Ser151Cys, Tyr50Cys-Ser151Cys, Thr51Cys-Ser151Cys, Asp52Cys-Ser151Cys, Asp53Cys-Ser151Cys, Ala54Cys-Ser151Cys, Gln55Cys-Ser151Cys, Gln56Cys-Ser151Cys, Thr57Cys-Ser151Cys, Glu58Cys-Ser151Cys, Arg47Cys-Pro152Cys, Tyr48Cys-Pro152Cys, Leu49Cys-Pro152Cys, Tyr50Cys-Pro152Cys, Thr51Cys-Pro152Cys, Asp52Cys-Pro152Cys, Asp53Cys-Pro152Cys, Ala54Cys-Pro152Cys, Gln55Cys-Pro152Cys, Gln56Cys-Pro152Cys, Thr57Cys-Pro152Cys, Glu58Cys-Pro152Cys, Arg47Cys-His153Cys, Tyr48Cys-His153Cys, Leu49Cys-His153Cys, Tyr50Cys-His153Cys, Thr51Cys-His153Cys, Asp52Cys-His153Cys, Asp53Cys-His153Cys, Ala54Cys-His153Cys, Gln55Cys-His153Cys, Gln56Cys-His153Cys, Thr57Cys-His153Cys, Glu58Cys-His153Cys, Arg47Cys-Arg154Cys, Tyr48Cys-Arg154Cys, Leu49Cys-Arg154Cys, Tyr50Cys-Arg154Cys, Thr51Cys-Arg154Cys, Asp52Cys-Arg154Cys, Asp53Cys-Arg154Cys, Ala54Cys-Arg154Cys, Gln55Cys-Arg154Cys, Gln56Cys-Arg154Cys, Thr57Cys-Arg154Cys, Glu58Cys-Arg154Cys, Arg47Cys-Asp155Cys, Tyr48Cys-Asp155Cys, Leu49Cys-Asp155Cys, Tyr50Cys-Asp155Cys, Thr51Cys-Asp155Cys, Asp52Cys-Asp155Cys, Asp53Cys-Asp155Cys, Ala54Cys-Asp155Cys, Gln55Cys-Asp155Cys, Gln56Cys-Asp155Cys, Thr57Cys-Asp155Cys, Glu58Cys-Asp155Cys, Arg47Cys-Pro156Cys, Tyr48Cys-Pro156Cys, Leu49Cys-Pro156Cys, Tyr50Cys-Pro156Cys, Thr51Cys-Pro156Cys, Asp52Cys-Pro156Cys, Asp53Cys-Pro156Cys, Ala54Cys-Pro156Cys, Gln55Cys-Pro156Cys, Gln56Cys-Pro156Cys, Thr57Cys-Pro156Cys, Glu58Cys-Pro156Cys, Arg47Cys-Ala157Cys, Tyr48Cys-Ala157Cys, Leu49Cys-Ala157Cys, Tyr50Cys-Ala157Cys, Thr51Cys-Ala157Cys, Asp52Cys-Ala157Cys, Asp53Cys-Ala157Cys, Ala54Cys-Ala157Cys, Gln55Cys-Ala157Cys, Gln56Cys-Ala157Cys, Thr57Cys-Ala157Cys, Glu58Cys-Ala157Cys, Arg47Cys-Pro158Cys, Tyr48Cys-Pro158Cys, Leu49Cys-Pro158Cys, Tyr50Cys-Pro158Cys, Thr51Cys-Pro158Cys, Asp52Cys-

- Pro158Cys, Asp53Cys-Pro158Cys, Ala54Cys-Pro158Cys, Gln55Cys-Pro158Cys, Gln56Cys-Pro158Cys, Thr57Cys-Pro158Cys, Glu58Cys-Pro158Cys, Arg47Cys-Arg159Cys, Tyr48Cys-Arg159Cys, Leu49Cys-Arg159Cys, Tyr50Cys-Arg159Cys, Thr51Cys-Arg159Cys, Asp52Cys-Arg159Cys, Asp53Cys-Arg159Cys, Ala54Cys-Arg159Cys, Gln55Cys-Arg159Cys, Gln56Cys-Arg159Cys, Thr57Cys-Arg159Cys, Glu58Cys-Arg159Cys, Arg47Cys-G160Cys, Tyr48Cys-G160Cys, Leu49Cys-G160Cys, Tyr50Cys-Gly160Cys, Thr51Cys-Gly160Cys, Asp52Cys-Gly160Cys, Asp53Cys-Gly160Cys, Ala54Cys-Gly160Cys, Gln55Cys-Gly160Cys, Gln56Cys-Gly160Cys, Thr57Cys-Gly160Cys, Glu58Cys-Gly160Cys, Arg47Cys-Pro161Cys, Tyr48Cys-Pro161Cys, Leu49Cys-Pro161Cys, Tyr50Cys-Pro161Cys, Thr51Cys-Pro161Cys, Asp52Cys-Pro161Cys, Asp53Cys-Pro161Cys, Ala54Cys-Pro161Cys, Gln55Cys-Pro161Cys, Gln56Cys-Pro161Cys, Thr57Cys-Pro161Cys, Glu58Cys-Pro161Cys, Arg47Cys-Ala162Cys, Tyr48Cys-Ala162Cys, Leu49Cys-Ala162Cys, Tyr50Cys-Ala162Cys, Thr51Cys-Ala162Cys, Asp52Cys-Ala162Cys, Asp53Cys-Ala162Cys, Ala54Cys-Ala162Cys, Gln55Cys-Ala162Cys, Gln56Cys-Ala162Cys, Thr57Cys-Ala162Cys, Glu58Cys-Ala162Cys, Arg47Cys-Arg163Cys, Tyr48Cys-Arg163Cys, Leu49Cys-Arg163Cys, Tyr50Cys-Arg163Cys, Thr51Cys-Arg163Cys, Asp52Cys-Arg163Cys, Asp53Cys-Arg163Cys, Ala54Cys-Arg163Cys, Gln55Cys-Arg163Cys, Gln56Cys-Arg163Cys, Thr57Cys-Arg163Cys, Glu58Cys-Arg163Cys
- 20 **[000140]** Another aspect of the present invention provides fusion proteins comprising variants of wild-type human FGF21, or a biologically active peptide thereof, comprising a substitution of any charged and/or polar but uncharged amino acid at any of the amino acid positions indicated in the first embodiment of the present invention combined with the substitution of a cysteine at two or more amino acid positions indicated in the
- 25 second embodiment of the invention.

Improvements of the fusion proteins of the Invention Over Wild Type Protein Comparators and Variants Thereof

- [000141]** It is well known in the art that a significant challenge in the development of protein pharmaceuticals is to deal with the physical and chemical instabilities of proteins. This is even more apparent when a protein pharmaceutical formulation is intended to be a multiple use, injectable formulation requiring a stable, concentrated and preserved solution, while maintaining a favorable bioactivity profile. Biophysical characterization of wild-type FGF21 in the literature established that a concentrated protein solution (>5 mg/ml), when exposed to stress conditions, such as high temperature or low pH, lead to accelerated association and aggregation (i.e., poor physical stability and biopharmaceutical properties). Exposure of a concentrated protein solution of FGF21 to

pharmaceutical preservatives (e.g., m-cresol) also had a negative impact on physical stability.

[000142] Therefore, an embodiment of the present invention is to enhance physical stability of concentrated solutions, while maintaining chemical stability and biological potency, under both physiological and preserved formulation conditions. It is thought that association and aggregation may result from hydrophobic interactions, since, at a given protein concentration, temperature, and ionic strength have considerable impact on physical stability. For the most part, non-conserved, presumed surface exposed amino acid residues were targeted. The local environment of these residues was analyzed and, those that were not deemed structurally important were selected for mutagenesis. One method to initiate specific changes is to further decrease the pI of the protein by introducing glutamic acid residues ("glutamic acid scan"). It is hypothesized that the introduction of charged substitutes would inhibit hydrophobic-mediated aggregation via charge-charge repulsion and potentially improve preservative compatibility. In addition, one skilled in the art would also recognize that with sufficient degree of mutagenesis the pI could be shifted into a basic pH range by the introduction of positive charge with or without concomitant decrease in negative charge, thus allowing for charge-charge repulsion.

[000143] An additional difficulty associated with therapeutic applications of wild-type FGF21 as a biotherapeutic, for instance, is that its half-life is very short *in vivo* (on the order of 0.5 and 2 h, respectively, in mouse and primate). There is hence a need to develop follow-up compounds that are more efficacious either through higher potency or longer half-life. The fusion proteins of the invention were developed as a way to achieve the desirable effects of FGF21 treatment at a higher potency and in a half-life-extended formulation.

[000144] As described further herein, the fusion proteins of the invention have half-lives of greater than two weeks in the mouse, compared to the much shorter half-life of wild-type FGF21 and the 17 hour half-life of fusion protein Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) in PCT Publication WO10/129600. The fusion proteins of the invention also demonstrate improved half-life and pharmacokinetic properties compared to PEGylated V76, as described herein and in US patent application 61/415,476, filed on November 19, 2010.

[000145] Furthermore, the Fc-FGF21 fusion proteins of the invention at 1 mpk are more efficacious than V76 at 5 mpk on reducing glucose, insulin, body weight and liver lipid. In a 12-day treatment study in ob/ob mice, the fusion proteins show the following % changes from vehicle (all of the fusions are administered at 1.0 mg/kg, and V76 is administered at 5.0 mg/kg):

[000146] Total glucose (AUC) % change from vehicle: V76 is -42%; V101 is -53%, V103 is -46%, and V188 is -42%;

[000147] Total plasma insulin % change from vehicle: V76 is -46%; V101 is -82%, V103 is -69%, and V188 is -59%;

5 **[000148]** Total body weight % change from vehicle: V76 is -7%; V101 is -12%, V103 is -12%, and V188 is -11%; and

[000149] Total liver lipid % change from vehicle: V76 is -30%; V101 is -44%, V103 is -50%, and V188 is -51%.

10 **[000150]** Similarly, in vitro assays reveal the same 5-fold or greater potency of the fusion proteins of the invention over V76:

[000151] In the pERK in human adipocytes assay (mean EC₅₀ ± SEM), V76 is 21 ± 2 nM (n=3); V101 is 1.0 ± 0.1 nM (n=3), V103 is 1.3 ± 0.2 nM (n=3), and V188 is 1.4 ± 0.4 nM (n=3);

15 **[000152]** In the pERK in HEK293 with human βklotho assay (mean EC₅₀ ± SEM), V76 is 13 ± 4 nM (n=5), V101 is 0.60 ± 0.06 nM (n=5), V103 is 0.9 ± 0.3 nM (n=5), and V188 is 0.4 ± 0.1 nM (n=3); and

[000153] In the glucose uptake in mouse adipocytes assay (mean EC₅₀ ± SEM), V76 is 5 ± 1 nM (n=3), V101 is 0.60 ± 0.06 nM (n=3), V103 is 0.60 ± 0.07 nM (n=3), and V188 is 0.48 ± 0.14 nM (n=3).

20 **[000154]** Although the embodiments of the present invention concern the physical and chemical stability under both physiological and preserved pharmaceutical formulation conditions, maintaining the biological potency of the fusion proteins of the invention as compared to, e.g., wild-type FGF21 is an important factor of consideration as well. Therefore, the biological potency of the proteins of the present invention is defined by
25 the ability of the proteins to affect glucose uptake and/or the lowering of plasma glucose levels, as shown herein in the examples.

[000155] The proteins, polypeptides, and/or peptides of the invention administered according to this invention may be generated and/or isolated by any means known in the art. The most preferred method for producing the variant is through recombinant
30 DNA methodologies and is well known to those skilled in the art. Such methods are described in Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.), which is incorporated herein by reference.

[000156] Additionally, the preferred embodiments include a biologically active peptide derived from the variant described herein. Such a peptide will contain at least one of
35 the substitutions described and the variant will possess biological activity. The peptide may be produced by any and all means known to those skilled in the art, examples of

which included but are not limited to enzymatic digestion, chemical synthesis or recombinant DNA methodologies.

[000157] It is established in the art that fragments of peptides of certain fibroblast growth factors are biologically active. See for example, Baird et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 85:2324-2328 (1988), and J. Cell. Phys. Suppl. 5:101-106 (1987). Therefore, the selection of fragments or peptides of the variant is based on criteria known in the art. For example, it is known that dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV, or DPP-4) is a serine type protease involved in inactivation of neuropeptides, endocrine peptides, and cytokines (Damme et al. Chem. Immunol. 72: 42-56, (1999)). The N-terminus of FGF21 (HisProllePro) contains two dipeptides that could potentially be substrates to DPP-IV, resulting in a fragment of FGF21 truncated at the N-terminus by 4 amino acids. Unexpectedly, this fragment of wild-type FGF21 has been demonstrated to retain biological activity, thus, proteins of the present invention truncated at the N-terminus by up to 4 amino acids, is an embodiment of the present invention.

[000158] The invention also encompasses polynucleotides encoding the above-described variants that may be in the form of RNA or in the form of DNA, which DNA includes cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA. The DNA may be double-stranded or single-stranded. The coding sequences that encode the proteins of the present invention may vary as a result of the redundancy or degeneracy of the genetic code.

[000159] The polynucleotides that encode for the fusion proteins of the invention may include the following: only the coding sequence for the variant, the coding sequence for the variant and additional coding sequence such as a functional polypeptide, or a leader or secretory sequence or a pro-protein sequence; the coding sequence for the variant and non-coding sequence, such as introns or non-coding sequence 5' and/or 3' of the coding sequence for the variant. Thus the term "polynucleotide encoding a variant" encompasses a polynucleotide that may include not only coding sequence for the variant but also a polynucleotide, which includes additional coding and/or non-coding sequence.

[000160] The invention further relates to variants of the described polynucleotides that encode for fragments, analogs and derivatives of the polypeptide that contain the indicated substitutions. The variant of the polynucleotide may be a naturally occurring allelic variant of the human FGF21 sequence, a non-naturally occurring variant, or a truncated variant as described above. Thus, the present invention also includes polynucleotides encoding the variants described above, as well as variants of such polynucleotides, which variants encode for a fragment, derivative or analog of the disclosed variant. Such nucleotide variants include deletion variants, substitution

variants, truncated variants, and addition or insertion variants as long as at least one of the indicated amino acid substitutions of the first or second embodiments is present.

5 **[000161]** The polynucleotides of the invention will be expressed in hosts after the sequences have been operably linked to (i.e., positioned to ensure the functioning of) an expression control sequence. These expression vectors are typically replicable in the host organisms either as episomes or as an integral part of the host chromosomal DNA. Commonly, expression vectors will contain selection markers, e.g., tetracycline, neomycin, and dihydrofolate reductase, to permit detection of those cells transformed with the desired DNA sequences. The FGF21 variant can be expressed in mammalian
10 cells, insect, yeast, bacterial or other cells under the control of appropriate promoters. Cell free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from DNA constructs of the present invention.

[000162] *E. coli* is a prokaryotic host useful particularly for cloning the polynucleotides of the present invention. Other microbial hosts suitable for use include *Bacillus subtilis*,
15 *Salmonella typhimurium*, and various species of *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus*, although others may also be employed as a matter of choice. In these prokaryotic hosts, one can also make expression vectors, which will typically contain expression control sequences compatible with the host cell (e.g., an origin of replication). In addition, any of a number of well-known promoters may be present, such
20 as the lactose promoter system, a tryptophan (Trp) promoter system, a beta-lactamase promoter system, or a promoter system from phages lambda or T7. The promoters will typically control expression, optionally with an operator sequence, and have ribosome binding site sequences and the like, for initiating and completing transcription and translation.

25 **[000163]** One skilled in the art of expression of proteins will recognize that methionine or methionine-arginine sequence can be introduced at the N-terminus of the mature sequence (SEQ ID NO: 3) for expression in *E. coli* and are contemplated within the context of this invention. Thus, unless otherwise noted, proteins of the present invention expressed in *E. coli* have a methionine sequence introduced at the N-terminus.

30 **[000164]** Other microbes, such as yeast or fungi, may also be used for expression. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Pichia angusta* are examples of preferred yeast hosts, with suitable vectors having expression control sequences, such as promoters, including 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, and an origin of replication, termination sequences and the like as
35 desired. *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*; and *Schizophyllum commune*, are examples of fungi hosts, although others may also be employed as a matter of choice.

[000165] Mammalian tissue cell culture may also be used to express and produce the polypeptides of the present invention. Eukaryotic cells are actually preferred, because a number of suitable host cell lines capable of secreting intact variants have been developed in the art, and include the CHO cell lines, various COS cell lines, NSO cells, Syrian Hamster Ovary cell lines, HeLa cells, or human embryonic kidney cell lines (i.e. HEK293, HEK293EBNA).

[000166] Expression vectors for these cells can include expression control sequences, such as an origin of replication, a promoter, an enhancer, and necessary processing information sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional terminator sequences. Preferred expression control sequences are promoters derived from SV40, adenovirus, bovine papilloma virus, cytomegalovirus, Raus sarcoma virus, and the like. Preferred polyadenylation sites include sequences derived from SV40 and bovine growth hormone.

[000167] The vectors containing the polynucleotide sequences of interest (e.g., the fusion proteins of the invention and expression control sequences) can be transferred into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment or electroporation may be used for other cellular hosts.

[000168] Various methods of protein purification may be employed and such methods are known in the art and described, for example, in Deutscher, Methods in Enzymology 182: 83-9 (1990) and Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982). The purification step(s) selected will depend, for example, on the nature of the production process used for the fusion proteins of the invention.

[000169] The proteins, polypeptides, and/or peptides of the invention, e.g., the dual activity fusion proteins of the invention, should be formulated and dosed in a fashion consistent with good medical practice, taking into account the clinical condition of the patient, the site of delivery of the protein compositions, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to practitioners. The "therapeutically effective amount" of the fusion proteins of the invention for purposes herein is thus determined by such considerations.

[000170] The pharmaceutical compositions of the proteins of the present invention may be administered by any means that achieve the generally intended purpose: to treat type 1 and type 2 diabetes mellitus, obesity, metabolic syndrome, or critically ill patients. Non-limiting permissible means of administration include, for example, by inhalation or suppository or to mucosal tissue such as by lavage to vaginal, rectal, urethral, buccal and sublingual tissue, orally, nasally, topically, intranasally,

intraperitoneally, parenterally, intravenously, intramuscularly, intrasternally, by intraarticular injection, intralymphatically, interstitially, intra-arterially, subcutaneously, intrasynovial, transepithelial, and transdermally. In some embodiments, the pharmaceutical compositions are administered by lavage, orally or inter-arterially. Other
5 suitable methods of introduction can also include rechargeable or biodegradable devices and slow or sustained release polymeric devices. The pharmaceutical compositions of this invention can also be administered as part of a combinatorial therapy with other known metabolic agents.

[000171] The dosage administered will be dependent upon the age, health, and weight
10 of the recipient, kind of concurrent treatment, if any, frequency of treatment, and the nature of the effect desired. Compositions within the scope of the invention include all compositions wherein an FGF21 variant is present in an amount that is effective to achieve the desired medical effect for treatment type 1 or type 2 diabetes mellitus, obesity, or metabolic syndrome. While individual needs may vary from one patient to
15 another, the determination of the optimal ranges of effective amounts of all of the components is within the ability of the clinician of ordinary skill.

[000172] The proteins of the present invention can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions. A desired formulation would be one that is a stable lyophilized product that is reconstituted with an appropriate
20 diluent or an aqueous solution of high purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, preservatives, excipients or stabilizers [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition (1980)]. The proteins of the present invention may be combined with a pharmaceutically acceptable buffer, and the pH adjusted to provide acceptable stability, and a pH acceptable for administration.

[000173] For parenteral administration, in one embodiment, the fusion proteins of the invention are formulated generally by mixing one or more of them at the desired degree of purity, in a unit dosage injectable form (solution, suspension, or emulsion), with a pharmaceutically acceptable carrier, i.e., one that is non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed and is compatible with other ingredients of the
30 formulation. Preferably, one or more pharmaceutically acceptable anti-microbial agents may be added. Phenol, m-cresol, and benzyl alcohol are preferred pharmaceutically acceptable anti-microbial agents.

[000174] Optionally, one or more pharmaceutically acceptable salts may be added to adjust the ionic strength or tonicity. One or more excipients may be added to further
35 adjust the isotonicity of the formulation. Glycerin, sodium chloride, and mannitol are examples of an isotonicity adjusting excipient.

[000175] Those skilled in the art can readily optimize pharmaceutically effective dosages and administration regimens for therapeutic compositions comprising Proteins of the invention, as determined by good medical practice and the clinical condition of the individual patient. A typical dose range for the proteins of the present invention will
5 range from about 0.01 mg per day to about 1000 mg per day (or about 0.05 mg per week to about 5000 mg per week administered once per week) for an adult. Preferably, the dosage ranges from about 0.1 mg per day to about 100 mg per day (or about 0.5 mg per week to about 500 mg per week administered once per week), more preferably from about 1.0 mg/day to about 10 mg/day (or about 5 mg per week to about 50 mg per week
10 administered once per week). Most preferably, the dosage is about 1-5 mg/day (or about 5 mg per week to about 25 mg per week administered once per week). The appropriate dose of an FGF21 variant administered will result in lowering blood glucose levels and increasing energy expenditure by faster and more efficient glucose utilization, and thus is useful for treating type 1 and type 2 diabetes mellitus, obesity and metabolic
15 syndrome.

[000176] In addition, because hyperglycemia and insulin resistance are common in critically ill patients given nutritional support, some ICUs administer insulin to treat excessive hyperglycemia in fed critically ill patients. In fact, recent studies document the use of exogenous insulin to maintain blood glucose at a level no higher than 110 mg per
20 deciliter reduced morbidity and mortality among critically ill patients in the surgical intensive care unit, regardless of whether they had a history of diabetes (Van den Berghe et al. N Engl J Med., 345(19):1359, (2001)). Thus, proteins of the present invention are uniquely suited to help restore metabolic stability in metabolically unstable critically ill patients. Proteins of the invention such as those containing variants of
25 FGF21 are unique in that they stimulate glucose uptake and enhances insulin sensitivity but do not induce hypoglycemia.

[000177] In another aspect of the present invention, proteins of the invention for use as a medicament for the treatment of obesity, type 1 and type 2 diabetes mellitus, pancreatitis, dyslipidemia, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), nonalcoholic
30 steatohepatitis (NASH), insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose intolerance, hyperglycemia, metabolic syndrome, acute myocardial infarction, conditions associated with severe inactivating mutations in the insulin receptor, and other metabolic disorders is contemplated.

35 **Site-Specific FGF21 Mutants**

[000178] In some embodiments, the fusion proteins of the invention include additional FGF21 mutants or FGF21 analogues with unnatural amino acids.

[000179] In some embodiments, the fusion proteins of the invention comprise FGF21 agonists with one or more of the following additional modifications of wild-type FGF21:

[000180] (i) additional disulfides, unnatural amino acids, or modifications to promote dimerization such as formation of a disulfide at R154C or introduction of a cysteine at another site, or dimerization through a fused Fc domain, or dimer formation through a cross-linker such as a bifunctional PEG;

[000181] (ii) fragments of FGF21;

[000182] (iii) proteins selected to have FGF21 activity (binding to beta-klotho and binding and activation of the FGFR's); and

10 **[000183]** (iv) an FGF21 mimetic antibody (of various formats such as Fab, unibody, svFc etc.).

[000184] In some embodiments, the fusion proteins of the invention comprise one or more of the following linkers: a simple amide bond, short peptides (particularly Ser/Gly repeats), additional residues from the FGF21 translated sequence, or a larger linker up to an entire protein (such as an Fc domain, an HSA-binding helix bundle, HSA, etc.). The two moieties can also be linked by other chemical means, such as through unnatural amino acids or standard chemical linkers (maleimide-Cys, NHS-Lys, click, etc.)

20 **[000185]** Other embodiments of the invention include but are not limited to the following attachments, for half-life extension: HSA-binding lipid or small molecule or micelle to either the monomeric or a dimeric version of the fusion.

[000186] In certain embodiments of the invention, other attachments may be made to proteins, polypeptides, and/or peptides of the invention, to achieve half-life extension and other improved biological properties. They can include attaching PEG-cholesterol conjugates (including micelles and liposomes) to the proteins, polypeptides, and/or peptides of the invention, and/or attaching sugars (glycosylate) to the proteins, polypeptides, and/or peptides of the invention. In still other embodiments, similar techniques are employed to add conjugates of, e.g., polysialic acid (PSA), hydroxyethyl starch (HES), albumin-binding ligands, or carbohydrate shields to proteins, polypeptides, and/or peptides.

30 **[000187]** The HESylation technique, for example, couples branched hydroxyethylstarch (HES) chains (60 kDa or 100 kDa, highly branched amylopectin fragments from corn starch) to a protein, polypeptides, and/or peptides via reductive alkylation. Polysialation conjugates proteins, polypeptides, and/or peptides of interest with polysialic acid (PSA) polymers in a manner similar to PEGylation. PSA polymers are negatively charged, non-immunogenic polymers that occur naturally in the body and are available in molecular weights of 10-50kD.

[000188] In still other embodiments of the invention, other attachments or modifications may be made to proteins, polypeptides, and/or peptides of the invention, to achieve half-life extension and other improved biological properties. These include the creation of recombinant PEG (rPEG) groups, and their attachment to the proteins, polypeptides, and/or peptides of the invention. As developed by the company Amunix, Inc. The rPEG technology is based on protein sequences with PEG-like properties that are genetically fused to biopharmaceuticals, avoiding the extra chemical conjugation step. rPEGs are extended half-life exenatide constructs that contain a long unstructured tail of hydrophilic amino acids, and which are capable of both increasing a protein or peptide's serum half-life and slowing its rate of absorption, thus reducing the peak-trough ratio significantly. rPEGs have an increased hydrodynamic radius and show an apparent molecular weight that is about 15-fold their actual molecular weight, mimicking the way PEGylation achieves a long serum half-life.

15 **Truncated FGF21 Polypeptides**

[000189] One embodiment of the present invention is directed to truncated forms of the mature FGF21 polypeptide (SEQ ID NO:3). This embodiment of the present invention arose from an effort to identify truncated FGF21 polypeptides that are capable of providing an activity that is similar, and in some instances superior, to untruncated forms of the mature FGF21 polypeptide.

[000190] As used herein, the term "truncated FGF21 polypeptide" refers to an FGF21 polypeptide in which amino acid residues have been removed from the amino-terminal (or N-terminal) end of the FGF21 polypeptide, amino acid residues have been removed from the carboxyl-terminal (or C-terminal) end of the FGF21 polypeptide, or amino acid residues have been removed from both the amino-terminal and carboxyl-terminal ends of the FGF21 polypeptide. The various truncations disclosed herein were prepared as described herein.

[000191] The activity of N-terminally truncated FGF21 polypeptides and C-terminally truncated FGF21 polypeptides can be assayed using an in vitro phospho-ERK assay. Specific details of the in vitro assays that can be used to examine the activity of truncated FGF21 polypeptides can be found in the examples.

[000192] The activity of the truncated FGF21 polypeptides of the present invention can also be assessed in an in vivo assay, such as ob/ob mice. Generally, to assess the in vivo activity of a truncated FGF21 polypeptide, the truncated FGF21 polypeptide can be administered to a test animal intraperitoneally. After a desired incubation period (e.g., one hour or more), a blood sample can be drawn, and blood glucose levels can be measured.

[000193] a. N-Terminal Truncations

[000194] In some embodiments of the present invention, N-terminal truncations comprise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8 amino acid residues from the N-terminal end of the mature FGF21 polypeptide. Truncated FGF21 polypeptides having N-terminal

5 truncations of fewer than 9 amino acid residues retain the ability of the mature FGF21 polypeptide to lower blood glucose in an individual. Accordingly, in particular embodiments, the present invention encompasses truncated forms of the mature FGF21 polypeptide or FGF21 protein variants having N-terminal truncations of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8 amino acid residues.

10 **[000195] b. C-Terminal Truncations**

[000196] In some embodiments of the present invention, C-terminal truncations comprise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, or 12 amino acid residues from the C-terminal end of the mature FGF21 polypeptide. Truncated FGF21 polypeptides having C-terminal truncations of fewer than 13 amino acid residues exhibited an efficacy of at

15 least 50% of the efficacy of wild-type FGF21 in an in vitro ELK-luciferase assay (Yie J. et al. FEBS Letts 583:19-24 (2009)), indicating that these FGF21 mutants retain the ability of the mature FGF21 polypeptide to lower blood glucose in an individual. Accordingly, in particular embodiments, the present invention encompasses truncated forms of the mature FGF21 polypeptide or FGF21 protein variants having C-terminal

20 truncations of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, or 12 amino acid residues.

[000197] c. N-Terminal and C-Terminal Truncations

[000198] In some embodiments of the present invention, truncated FGF21 polypeptides can have a combination of N-terminal and C-terminal truncations. Truncated FGF21 polypeptides having a combination of N-terminal and C-terminal

25 truncations share the activity of corresponding truncated FGF21 polypeptides having either the N-terminal or C-terminal truncations alone. In other words, truncated FGF21 polypeptides having both N-terminal truncations of fewer than 9 amino acid residues and C-terminal truncations of fewer than 13 amino acid residues possess similar or greater blood glucose-lowering activity as truncated FGF21 polypeptides having N-

30 terminal truncations of fewer than 9 amino acid residues or truncated FGF21 polypeptides having C-terminal truncations of fewer than 13 amino acid residues. Accordingly, in particular embodiments, the present invention encompasses truncated forms of the mature FGF21 polypeptide or FGF21 protein variants having both N-terminal truncations of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8 amino acid residues and C-terminal

35 truncations of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, or 12 amino acid residues.

[000199] As with all FGF21 variants of the present invention, truncated FGF21 polypeptides can optionally comprise an amino-terminal methionine residue, which can be introduced by directed mutation or as a result of a bacterial expression process.

[000200] The truncated FGF21 polypeptides of the present invention can be prepared
5 as described in the examples described herein. Those of ordinary skill in the art, familiar with standard molecular biology techniques, can employ that knowledge, coupled with the instant disclosure, to make and use the truncated FGF21 polypeptides of the present invention. Standard techniques can be used for recombinant DNA, oligonucleotide synthesis, tissue culture, and transformation (e.g., electroporation,
10 lipofection). See, e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, supra, which is incorporated herein by reference for any purpose. Enzymatic reactions and purification techniques can be performed according to manufacturer's specifications, as commonly accomplished in the art, or as described herein. Unless specific definitions are provided, the nomenclatures utilized in connection with, and the laboratory
15 procedures and techniques of, analytical chemistry, synthetic organic chemistry, and medicinal and pharmaceutical chemistry described herein are those well known and commonly used in the art. Standard techniques can be used for chemical syntheses; chemical analyses; pharmaceutical preparation, formulation, and delivery; and treatment of patients.

[000201] The truncated FGF21 polypeptides of the present invention can also be
20 fused to another entity, which can impart additional properties to the truncated FGF21 polypeptide. In one embodiment of the present invention, a truncated FGF21 polypeptide can be fused to an IgG constant domain or fragment thereof (e.g., the Fc region), Human Serum Albumin (HSA), or albumin-binding polypeptides. Such fusion
25 can be accomplished using known molecular biological methods and/or the guidance provided herein. The benefits of such fusion polypeptides, as well as methods for making such fusion polypeptides, are discussed in more detail herein.

FGF21 Fusion Proteins

[000202] As used herein, the term "FGF21 fusion polypeptide" or "FGF21 fusion
30 protein" refers to a fusion of one or more amino acid residues (such as a heterologous protein or peptide) at the N-terminus or C-terminus of any FGF21 protein variant described herein.

[000203] FGF21 fusion proteins can be made by fusing heterologous sequences at
35 either the N-terminus or at the C-terminus of, for example, an FGF21 protein variant, as defined herein. As described herein, a heterologous sequence can be an amino acid sequence or a non-amino acid-containing polymer. Heterologous sequences can be

fused either directly to the FGF21 protein variant or via a linker or adapter molecule. A linker or adapter molecule can be one or more amino acid residues (or -mers), e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, or 9 residues (or -mers), preferably from 10 to 50 amino acid residues (or -mers), e.g., 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 residues (or -mers), and more preferably from 15 to 35 amino acid residues (or -mers). A linker or adapter molecule can also be designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease or for a protease to allow for the separation of the fused moieties.

[000204] Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to, an epitope to allow for the detection and/or isolation of an FGF21 protein variant; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain or a transmembrane and intracellular domain; a ligand or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a polypeptide or peptide which increases stability, such as an immunoglobulin constant region; a functional or non-functional antibody, or a heavy or light chain thereof; and a polypeptide which has an activity, such as a therapeutic activity, different from the FGF21 protein variants of the present invention. Also encompassed by the present invention are FGF21 mutants fused to human serum albumin (HSA).

[000205] a. Fc Fusions

[000206] In one embodiment of the present invention, an FGF21 protein variant is fused to one or more domains of an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab," that binds an antigen, and a constant domain known as "Fc," that is involved in effector functions such as complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas a Fab is short-lived (Capon et al., 1989, Nature 337: 525-31). When joined together with a therapeutic protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding, protein A binding, complement fixation, and perhaps even placental transfer (Capon et al., 1989).

[000207] Throughout the disclosure, Fc-FGF21 refers to a fusion protein in which the Fc sequence is fused to the N-terminus of FGF21. Similarly, throughout the disclosure, FGF21-Fc refers to a fusion protein in which the Fc sequence is fused to the C-terminus of FGF21.

[000208] Preferred embodiments of the invention are Fc-FGF21 fusion proteins comprising FGF21 variants as defined herein. Particularly preferred embodiments are

Fc-FGF21 fusion proteins comprising a modified Fc fragment (e.g., an FcLALA) and FGF21 variants as defined herein.

[000209] Fusion protein can be purified, for example, by the use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life in vivo than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the fusion polypeptide. The Fc region can be a naturally occurring Fc region, or can be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, or reduced aggregation.

[000210] Useful modifications of protein therapeutic agents by fusion with the "Fc" domain of an antibody are discussed in detail in PCT Publication No. WO 00/024782. This document discusses linkage to a "vehicle" such as polyethylene glycol (PEG), dextran, or an Fc region.

[000211] b. Fusion Protein Linkers

[000212] When forming the fusion proteins of the present invention, a linker can, but need not, be employed. When present, the linker's chemical structure may not critical, since it serves primarily as a spacer. The linker can be made up of amino acids linked together by peptide bonds. In some embodiments of the present invention, the linker is made up of from 1 to 20 amino acids linked by peptide bonds, wherein the amino acids are selected from the 20 naturally occurring amino acids. In various embodiments, the 1 to 20 amino acids are selected from the amino acids glycine, serine, alanine, proline, asparagine, glutamine, and lysine. In some embodiments, a linker is made up of a majority of amino acids that are sterically unhindered, such as glycine and alanine. In some embodiments, linkers are polyglycines, polyalanines, combinations of glycine and alanine (such as poly(Gly-Ala)), or combinations of glycine and serine (such as poly(Gly-Ser)). While a linker of 15 amino acid residues has been found to work particularly well for FGF21 fusion proteins, the present invention contemplates linkers of any length or composition.

[000213] The linkers described herein are exemplary, and linkers that are much longer and which include other residues are contemplated by the present invention. Non-peptide linkers are also contemplated by the present invention. For example, alkyl linkers such as can be used. These alkyl linkers can further be substituted by any non-sterically hindering group, including, but not limited to, a lower alkyl (e.g., C1-C6), lower acyl, halogen (e.g., Cl, Br), CN, NH₂, or phenyl. An exemplary non-peptide linker is a polyethylene glycol linker, wherein the linker has a molecular weight of 100 to 5000 kD, for example, 100 to 500 kD.

[000214]

Chemically-Modified Fusion Proteins

[000215] Chemically modified forms of the fusion proteins described herein, including, e.g., truncated and variant forms of the FGF21 fusions described herein, can be prepared by one skilled in the art, given the disclosures described herein. Such

5 chemically modified Fusion Proteins are altered such that the chemically modified mutant is different from the unmodified mutant, either in the type or location of the molecules naturally attached to the mutant. Chemically modified mutants can include molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups.

[000216] In one embodiment, proteins of the present invention can be modified by the
10 covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is typically water-soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable. Non-
15 water soluble polymers conjugated to proteins of the present invention also form an aspect of the invention.

[000217] Exemplary polymers each can be of any molecular weight and can be branched or unbranched. The polymers each typically have an average molecular weight of between about 2 kDa to about 100 kDa (the term "about" indicating that in
20 preparations of a water-soluble polymer, some molecules will weigh more and some less than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferably between about 5 kDa and about 50 kDa, more preferably between about 12 kDa and about 40 kDa, and most preferably between about 20 kDa and about 35 kDa.

[000218] Suitable water-soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C1-C10), alkoxy-, or aryloxy-polyethylene glycol), monomethoxy-polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight dextran of, for example, about 6 kD),
30 cellulose, or other carbohydrate based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), and polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional crosslinking molecules that can be used to prepare covalently attached FGF21 protein variant multimers. Also
35 encompassed by the present invention are FGF21 mutants covalently attached to polysialic acid.

[000219] Polysaccharide polymers are another type of water-soluble polymer that can be used for protein modification. Therefore, the fusion proteins of the invention fused to a polysaccharide polymer form embodiments of the present invention. Dextrans are polysaccharide polymers comprised of individual subunits of glucose predominantly
5 linked by alpha 1-6 linkages. The dextran itself is available in many molecular weight ranges, and is readily available in molecular weights from about 1 kD to about 70 kD. Dextran is a suitable water-soluble polymer for use as a vehicle by itself or in combination with another vehicle (e.g., Fc). See, e.g., International Publication No. WO 96/11953. The use of dextran conjugated to therapeutic or diagnostic immunoglobulins
10 has been reported. See, e.g., European Patent Publication No. 0 315 456, which is hereby incorporated by reference. The present invention also encompasses the use of dextran of about 1 kD to about 20 kD.

[000220] In general, chemical modification can be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for
15 preparing chemically modified polypeptides will generally comprise the steps of: (a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby a FGF21 protein variant becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction products. The optimal reaction conditions will be determined based on known
20 parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of polymer molecules to protein, the greater the percentage of attached polymer molecule. In one embodiment of the present invention, chemically modified FGF21 mutants can have a single polymer molecule moiety at the amino-terminus (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,234,784)

[000221] In another embodiment of the present invention, Proteins of the invention can be chemically coupled to biotin. The biotin/Proteins of the invention are then allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent avidin/biotin/Proteins of the invention. Proteins of the invention can also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or anti-TNP-IgM to form
30 decameric conjugates with a valency of 10.

[000222] Generally, conditions that can be alleviated or modulated by the administration of the present chemically modified FGF21 mutants include those described herein for Proteins of the invention. However, the chemically modified FGF21 mutants disclosed herein can have additional activities, enhanced or reduced biological
35 activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to unmodified FGF21 mutants.

Therapeutic Compositions of Fusion Proteins and Administration Thereof

[000223] The present invention also provides therapeutic compositions comprising one or more of the fusion proteins of the invention described herein and in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent or

5 pharmaceutically acceptable carrier selected for suitability with the mode of administration. The compositions are specifically contemplated in light of, e.g., the identification of fusions proteins exhibiting enhanced properties.

[000224] In some embodiments the therapeutic compositions are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, 10 or suspension in, liquid vehicles prior to injection can also be prepared. Liposomes are included within the definition of a pharmaceutically acceptable carrier. Pharmaceutically acceptable salts can also be present in the pharmaceutical composition, e.g., mineral acid salts such as hydrochlorides, hydrobromides, phosphates, sulfates, and the like; and the salts of organic acids such as acetates, propionates, malonates, benzoates, 15 and the like. A thorough discussion of pharmaceutically acceptable excipients is available in Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkins.

[000225] Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

20 **[000226]** The pharmaceutical composition can contain formulation materials for modifying, maintaining, or preserving, for example, the pH, osmolarity, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption, or penetration of the composition. Suitable formulation materials include, but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, or lysine), 25 antimicrobials, antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite, or sodium hydrogen-sulfite), buffers (such as borate, bicarbonate, Tris-HCl, citrates, phosphates, or other organic acids), bulking agents (such as mannitol or glycine), chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)), complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin, or hydroxypropyl-beta-cyclodextrin), fillers, 30 monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrans), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents, hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, 35 thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid, or hydrogen peroxide), solvents (such as glycerin, propylene glycol, or polyethylene glycol), sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol), suspending agents,

surfactants or wetting agents (such as pluronics; PEG; sorbitan esters; polysorbates such as polysorbate 20 or polysorbate 80; triton; tromethamine; lecithin; cholesterol or tyloxapal), stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol), tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides; preferably sodium or potassium chloride; or mannitol sorbitol), delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants (see, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), and subsequent editions of the same, incorporated herein by reference for any purpose).

[000227] The optimal pharmaceutical composition will be determined by a skilled artisan depending upon, for example, the intended route of administration, delivery format, and desired dosage (see, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*). Such compositions can influence the physical state, stability, rate of in vivo release, and rate of in vivo clearance of the fusion protein of the invention.

[000228] The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition can be either aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier for injection can be water, physiological saline solution, or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which can further include sorbitol or a suitable substitute. In one embodiment of the present invention, dual function pharmaceutical compositions can be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional formulation agents (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the dual function protein product can be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

[000229] The pharmaceutical compositions containing the fusion proteins of the invention can be selected for parenteral delivery. Alternatively, the compositions can be selected for inhalation or for delivery through the digestive tract, such as orally. The preparation of such pharmaceutically acceptable compositions is within the skill of the art.

[000230] The formulation components are present in concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range of from about 5 to about 8.

[000231] When parenteral administration is contemplated, the therapeutic compositions for use in this invention can be in the form of a pyrogen-free, parenterally

acceptable, aqueous solution comprising the desired dual function protein in a pharmaceutically acceptable vehicle. A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile distilled water in which a dual function protein is formulated as a sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another preparation can involve the formulation of the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles, polymeric compounds (such as polylactic acid or polyglycolic acid), beads, or liposomes, that provides for the controlled or sustained release of the product which can then be delivered via a depot injection. Hyaluronic acid can also be used, and this can have the effect of promoting sustained duration in the circulation. Other suitable means for the introduction of the desired molecule include implantable drug delivery devices.

[000232] In one embodiment, a pharmaceutical composition can be formulated for inhalation. For example, a dual function protein of the invention can be formulated as a dry powder for inhalation. Dual function protein inhalation solutions can also be formulated with a propellant for aerosol delivery. In yet another embodiment, solutions can be nebulized. Pulmonary administration is further described in International Publication No. WO 94/20069, which describes the pulmonary delivery of chemically modified proteins.

[000233] It is also contemplated that certain formulations can be administered orally. In one embodiment of the present invention, Fusion Proteins of the invention that are administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily used in the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule can be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is maximized and pre-systemic degradation is minimized. Additional agents can be included to facilitate absorption of the fusion proteins of the invention. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders can also be employed.

[000234] Another pharmaceutical composition can involve an effective quantity of the fusion proteins of the invention in a mixture with non-toxic excipients that are suitable for the manufacture of tablets. By dissolving the tablets in sterile water, or another appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit-dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, or talc.

[000235] Additional pharmaceutical compositions comprising Fusion Proteins of the invention will be evident to those skilled in the art, including formulations involving Fusion Proteins of the invention in sustained- or controlled-delivery formulations. Techniques for formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, bio-erodible microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those skilled in the art (see, e.g., International Publication No. WO 93/15722, which describes the controlled release of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions, and Wischke & Schwendeman, 2008, *Int. J Pharm.* 364: 298-327, and Freiberg & Zhu, 2004, *Int. J Pharm.* 282: 1-18, which discuss microsphere/microparticle preparation and use).

[000236] Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles, e.g. films, or microcapsules. Sustained release matrices can include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919 and European Patent No. 0 058 481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 22: 547-56), poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105), ethylene vinyl acetate (Langer et al., *supra*) or poly-D-3-hydroxybutyric acid (European Patent No. 0 133 988). Sustained-release compositions can also include liposomes, which can be prepared by any of several methods known in the art. See, e.g., Epstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3688-92; and European Patent Nos. 0 036 676, 0 088 046, and 0 143 949.

[000237] The pharmaceutical compositions of the invention to be used for in vivo administration typically must be sterile. This can be accomplished by filtration through sterile filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using this method can be conducted either prior to, or following, lyophilization and reconstitution. The composition for parenteral administration can be stored in lyophilized form or in a solution. In addition, parenteral compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

[000238] Once the pharmaceutical composition has been formulated, it can be stored in sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or lyophilized powder. Such formulations can be stored either in a ready-to-use form or in a form (e.g., lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

[000239] In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits can each contain both a first container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation.

Also included within the scope of this invention are kits containing single and multi-chambered pre-filled syringes (e.g., liquid syringes and lyosyringes).

Dosages of Fusion Proteins and Administration Thereof

5 **[000240]** The effective amount of a pharmaceutical composition of the invention to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives. One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the indication for which the fusion protein variant is being used, the route of administration, and the
10 size (body weight, body surface, or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician can titer the dosage and modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage can range from about 0.1 µg/kg to up to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage can range from 0.1 µg/kg up to
15 about 100 mg/kg; or 1 µg/kg up to about 100 mg/kg.

[000241] The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the dual function protein in the formulation being used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition can therefore be administered as a single dose, as two or more doses
20 (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages can be ascertained through use of appropriate dose-response data.

25 **[000242]** The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, e.g., orally; through injection by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intraparenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems (which may also be injected); or by implantation devices. Where desired, the compositions can be
30 administered by bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

[000243] Alternatively or additionally, the composition can be administered locally via implantation of a membrane, sponge, or other appropriate material onto which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device can be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the
35 desired molecule can be via diffusion, timed-release bolus, or continuous administration.

Therapeutic Uses of Fusion Proteins

[000244] Proteins of the invention can be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent a number of diseases, disorders, or conditions, including, but not limited to metabolic disorders. In one embodiment, the metabolic disorder to be treated is diabetes, e.g., type 2 diabetes mellitus. In another embodiment, the metabolic disorder is obesity. Other embodiments include metabolic conditions or disorders such as type 1 diabetes mellitus, pancreatitis, dyslipidemia, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), nonalcoholic steatohepatitis (NASH), insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose intolerance, hyperglycemia, metabolic syndrome, hypertension, cardiovascular disease, acute myocardial infarction, atherosclerosis, peripheral arterial disease, stroke, heart failure, coronary heart disease, kidney disease, diabetic complications, neuropathy, disorders associated with severe inactivating mutations in the insulin receptor, gastroparesis and other metabolic disorders.

[000245] In application, a disorder or condition such as type 1 or type 2 diabetes mellitus or obesity can be treated by administering an FGF21 protein variant as described herein to a patient in need thereof in the amount of a therapeutically effective dose. The administration can be performed as described herein, such as by IV injection, intraperitoneal injection, intramuscular injection, or orally in the form of a tablet or liquid formation. In most situations, a desired dosage can be determined by a clinician, as described herein, and can represent a therapeutically effective dose of the FGF21 mutant polypeptide. It will be apparent to those of skill in the art that a therapeutically effective dose of FGF21 mutant polypeptide will depend, inter alia, upon the administration schedule, the unit dose of antigen administered, whether the nucleic acid molecule or polypeptide is administered in combination with other therapeutic agents, the immune status and the health of the recipient. The term "therapeutically effective dose," as used herein, means that amount of FGF21 mutant polypeptide that elicits the biological or medicinal response in a tissue system, animal, or human being sought by a researcher, medical doctor, or other clinician, which includes alleviation of the symptoms of the disease or disorder being treated.

[000246] Having now described the present invention in detail, the same will be more clearly understood by reference to the following examples, which are included herewith for purposes of illustration only and are not intended to be limiting of the invention.

[000247] The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional methods of chemistry, biochemistry, molecular biology, immunology and pharmacology, within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick

and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); and Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); and Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989).

5

EXAMPLES

Example 1: Preparation of FGF21 Variant Proteins

[000248] Expression construct for FGF21 V76: The FGF21 variants were cloned into the modified *E.coli* expression vector pET30a, described by Achmuller et al. (2007) (Nature Methods 4:1037-1043), to generate in-frame fusions to a hexa-histidine tag followed by the N^{pro}-EDDIE tag at the N-terminus of FGF21 (aa 33-209).

[000249] Expression and purification of FGF21 V76: The pET30a-His-N^{pro}-EDDIE-FGF21 expression plasmid was transformed into *E. coli* BL21 Star (DE3) competent cells (Invitrogen). Overnight growth from a single colony of freshly transformed cells was carried out in 50 mL of Terrific Broth (TB) containing 50 µg/mL of kanamycin at 37°C. The pre-culture was transferred into 1 L of TB medium with kanamycin and cultured in baffled flasks at 37°C with shaking at 250 rpm. After 6 hour of culture, expression of FGF21 was induced by the addition of IPTG at a final concentration of 1 mM, and the cultures were grown overnight at 37°C. The cells were then harvested and resuspended into 50 mL of ice-cold lysis buffer; 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, followed by lysis using a microfluidizerTM.

[000250] Inclusion bodies (IBs) were precipitated by centrifugation at 30,000 x g for 1 hour at 4°C. The IBs were washed with 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl and then dissolved into 30 mL of dissolving buffer; 10 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaH₂PO₄, 6 M GnHCl. The dissolved IBs were clarified by centrifugation at 30,000 x g for 1 hour at 25°C. The IB solution was loaded onto a 5 mL column of Ni-NTA high performance resin (GE Healthcare) equilibrated with the dissolving buffer. Proteins bound to the resin were eluted by decreasing the pH to 4.5. The eluate was conditioned by adjusting pH and adding dithiothreitol (DTT) at a concentration of 20 mM. The conditioned eluate was slowly diluted into 1 L of refolding buffer; 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.5 M arginine, 20 mM DTT, followed by incubation for 2 days at 4°C. The diluted sample was concentrated and buffer-exchanged into 20 mM Tris-HCl, pH 9 using an ultrafiltration method. The concentrated sample was loaded onto a 10 mL column of Q sepharose fast flow resin (GE Healthcare) equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH9).

[000251] After washing the resin with the equilibration buffer, proteins bound to the resin were eluted with 20 mM Tris-HCl, pH 9, 500 mM NaCl. To remove the cleaved off His-N^{pro} fusion fragment and any uncleaved fusion protein from the refolded FGF21

protein, the eluate was loaded onto a 5 mL column of Ni-NTA high performance resin equilibrated with 20 mM Tris, pH 8.0, 50 mM imidazole, and the flow-through fraction containing FGF21 was collected. To reduce endotoxin levels, the FGF21 fraction was treated with an EndoTrap HD resin (Hyglos) equilibrated with 10 mM Tris, pH 8, 50 mM imidazole, 500 mM NaCl, 1 mM CaCl₂. The low-endotoxin sample was dialyzed against PBS and then sterilized with a 0.22 µm filter. The purified FGF21 protein was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Protein concentration was determined by absorbance at 280 nm using 9362 M⁻¹ cm⁻¹ as the molar extinction coefficient for FGF21. Protein purity and integrity were determined by HPLC, SDS-PAGE and liquid chromatography-mass spectrometry.

[000252] Cysteine PEGylation of FGF21 variants: FGF21 Variant V76 (R154C) variant has the tendency to dimerize via the engineered cysteine; therefore, prior to PEGylation the protein solution (typically 5 mg/mL in Tris buffer) was mildly reduced with 5 mM mercaptoethylamine for 30 minutes on ice and immediately desalted in 20 mM Tris, pH 7. The freshly reduced protein (typically 3 mg/mL) was then immediately PEGylated with 1.5 equivalent of 40 kDa branched maleimido-PEG reagent (NOF, Cat. # GL2-400MA from the Sunbright series) for 3 hours on ice. The PEGylated protein was finally purified by anion exchange chromatography (MonoQ) with overall yields of about 25%.

[000253] Expression constructs for Fc-FGF21 fusion variants: The cDNAs for human FGF21 variants encoding amino acids 33-209 were cloned into a mammalian expression vector downstream of the cytomegalovirus (CMV) promoter in-frame with N-terminal sequences including a leader peptide (immunoglobulin kappa-chain) to direct secretion of the proteins, followed by an Fc domain and a short linker.

[000254] Expression and purification of Fc-FGF21 variants: The Fc-FGF21 variant proteins were expressed into HEK293T cells (American Type Culture Collection). Cells were grown in suspension culture at 37°C, 8%CO₂, in Freestyle 293 Expression Medium (Invitrogen, Cat. #12338-018) until day of transfection. Cells were centrifuged at 1000xg for 7 min in a swinging bucket rotor and counted using an automated cell counter. Cells were diluted in 900 mL of Freestyle 293 media to a final concentration of 1.4x10⁶ cells/mL and placed into a 3 L non-baffled flask (Corning, Cat. #431252). Cells were transfected using a mixture of polyethyleneimine (PEI) and plasmid as follows. Three mL of a sterile 1 mg/mL stock of linear, M.W. 25,000, PEI (Alfa Aesar, Cat.#43896) was added to 50 mL of Freestyle 293 media, mixed gently and incubated at 25°C for 5 minutes. At the same time, 1 mg of endotoxin-free plasmid was added to 50 mL Freestyle 293 media and sterile filtered using a 0.22 µm filter. The PEI mixture was then added to the sterile filtered DNA, mixed gently and allowed to incubate at 25°C

for 10 minutes. The PEI-plasmid mixture was then added to the 3 L flask containing the diluted HEK 293T cells and placed at in a shaking incubator at 125 RPM, 37°C, 8% CO₂.

[000255] On day 6 post-transfection, the cells were centrifuged at 2000xg for 10 minutes and the supernatant was harvested. The supernatant was further clarified by filtration through a 0.8/0.2 µm filter (Pall Corporation, Cat. #4628).

[000256] Batch purification of the FGF21 protein was done by adding 1 mL of recombinant Protein A Sepharose Fast Flow (GE, Cat. #17-5138-03), per 20 mg of expected protein to be purified, directly to the clarified supernatant and incubating for 1 hour at 4°C with gentle rotation. The supernatant mixture was then poured over a disposable Poly-Prep Chromatography Column (Bio-Rad, Cat. #731-1550) and the flow through was discarded. The retained beads were washed with 5 column volumes of DPBS, pH7.4 (Invitrogen, Cat. #14190-144). Elution of the protein from the Protein A beads was done by adding 20 column volumes of 50 mM Sodium Citrate buffer, pH 3.0.

The elution buffer was neutralized by the addition of 20% Tris-HCL buffer, pH 9.0. Size exclusion chromatography was performed as a secondary polishing step by running the Protein A batch purified material over a High Load 26/600 Superdex 200pg column (GE, Cat. #28-9893-36). The purified protein yield was quantified by A280. SDS-Page was run to verify purity and molecular weight. Endotoxin level was quantified by using the Endosafe PTS system (Charles River Labs).

Example 2: Measuring FGF21 Dependent 2-Deoxyglucose (2-DOG) Uptake

[000257] FGF21 has been shown to stimulate glucose-uptake in mouse 3T3-L1 adipocytes in the presence and absence of insulin, and to decrease fed and fasting blood glucose, triglycerides, and glucagon levels in *ob/ob* and *db/db* mice and 8 week old ZDF rats in a dose-dependent manner, thus, providing the basis for the use of FGF21 as a therapy for treating diabetes and obesity (see, e.g., patent publication WO03/011213, and Kharitonov et al., (2005) Jour. of Clinical Invest. 115:1627-1635). Also, FGF21 was observed to stimulate tyrosine phosphorylation of FGFR-1 and FGFR-2 in 3T3-L1 adipocytes.

[000258] 3T3-L1 fibroblasts were purchased from ATCC (Cat. # CL173). The cells were grown to confluency in 150 cm petri-dish and were maintained in DMEM with high glucose (Invitrogen, Cat. # 11995065) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% penicillin-streptomycin for an additional 4 days. Cells were then differentiated in the above media supplemented with 4 µg/mL insulin (Sigma, Cat. # I-5500), 115 µg/mL IBMX (Sigma, Cat. # I5879) and 0.0975 µg/mL dexamethasone (Sigma, Cat. #D1756) for 3 days after which the differentiation media was replaced with complete DMEM. One

plate of differentiated 3T3-L1 adipocytes were seeded into four 96-well plates the day after medium replacement.

[000259] The adipocytes were then treated with FGF21-WT and FGF21 variant protein (see Table 2 for list of variants; 30 pM to 100 nM is the typical concentration range used) overnight in complete medium. The adipocytes treated with FGF21 samples were serum starved in 50 μ L per well KRH buffer (0.75% NaCl; 0.038% KCl; 0.0196% CaCl_2 ; 0.032% MgSO_4 ; 0.025M HEPES, pH 7.5; 0.5% BSA; 2 mM sodium pyruvate) for 2 hours. The wells for blank were added with 1 μ L (final concentration 5 μ g/ml) cytochalasin B for 15 min. $[\text{3H}]\text{-2-DOG}$ (20.6 mCi/mmol, 1 mCi/mL) was diluted 1:20 in 5.1 mM cold 2-DOG and 1 μ L diluted 2-DOG was added per well and the cells were incubated for 5 min. The cells were washed with 100 μ L/well KRH buffer three times. 40 μ L/well 1% SDS was added to cells and the cells were shaken for at least 10 minutes. 200 μ L/well scintillation fluid was added and the plates were shaken overnight and read in beta-microplate reader. The values obtained from an entire column/row, which were treated with cytochalasin B, was averaged and subtracted from all other values. The data were analyzed by GraphPad Prism software, the results of which are summarized in Table 2. Fc-FGF21 Fusion Variants V101, V103 and V188 are superior to PEGylated FGF21 Variant V76 in for induction of 2-deoxyglucose uptake by mouse 3T3L1 adipocytes.

20

Example 3: pERK In Cell Western (ICW) Assay

[000260] HEK293 cells stably transfected with human β -klotho were cultured in DMEM high glucose, 10% FBS, 1% PS and 600 ng/mL G418 are seeded in poly-D-lysine coated 96-well plates (BD bioscience, Cat. #356640) at 30,000 cells per well overnight. The cells were serum starved in DMEM high glucose, 0.5 % BSA and 10 mM HEPES for 4 hours. WT FGF21 and the FGF21 variants (see Table 3 for list of variants) were diluted to various concentrations (100 pM to 300 nM is the typical concentration range used) in starvation medium. The cells were stimulated with FGF21 for 10 minutes. Following FGF21 or FGF21 Variant protein stimulation, the media was aspirated from the wells and the cells were washed once with 100 μ L cold PBS and then fixed with 100 μ L of 4% formaldehyde for 15 minutes at room temperature and followed by an additional 10 minute incubation with 100 μ L ice-cold methanol.

[000261] After fixation, the cells were washed with 0.3% Triton X-100 in PBS four times, 5 minutes each. 150 μ L Odyssey Blocking Buffer was added to the permeabilized cells at room temperature for 1.5 hours. Phospho-ERK (pERK) antibody was diluted to a concentration of 0.17 μ g/mL (1:200 dilution, or the dilutions indicated), and total-ERK (tERK) antibody was diluted to a concentration of 2.2 μ g/mL (1:200 dilution, or the

35

dilutions indicated) in Odyssey Blocking Buffer. 50 μ L was added to every well, omitting one column which was only treated with secondary antibody to normalize for background. The plate was covered with the wet paper tower and lid to prevent evaporation and then incubated at 4°C overnight.

- 5 **[000262]** Afterwards, the primary antibody was aspirated and the cells were washed four times with 0.3% Tween 20 in PBS for 5 minutes each. During the washing, the secondary antibody reaction mixture was prepared in Odyssey Blocking Buffer containing 1:1000-diluted (or the dilutions indicated) goat anti-mouse Alexa 680 and 1:1000-diluted (or the dilutions indicated) IRDye800 goat anti-rabbit antibody. Once the
- 10 washing was completed, 40 μ L of the reaction mixture was added to each well. Plates were covered with black lid to protect the secondary antibody from light, and plates were incubated at room temperature for 1 hour on a shaker. Finally, the cells were washed again four times with 0.3% Tween 20 in PBS for 5 minutes each and then scanned on the LI-COR Bioscience Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln,
- 15 NE) in the 700 nm (red) and 800 nm (green) channels. Alexa 680 stained the tERK with far-red fluorescence (emission wavelength 668 nm), while IRDye800 stained the pERK with green fluorescence (emission wavelength 800 nm). To eliminate the fluorescent background, the values obtained from an entire column/row, which was treated with only secondary antibody, was averaged and subtracted from all other values obtained from
- 20 the plate. For normalization of the amount of pERK present in each sample, the values for pERK in each well was divided by the values of tERK. The data were analyzed by GraphPad Prism software, the results of which are summarized in Table 2. Fc-FGF21 Fusion Variants V101, V103 and V188 are superior to PEGylated FGF21 Variant V76 in this ERK phosphorylation assay.

25

Table 2: Summary of ERK in cell Western and Mouse 3T3L1 Adipocyte Glucose Uptake Assay Results

FGF21 Variant ID	pERK (HEK293/human β -klotho) EC50 $\pm$ SEM	Glucose Uptake (Mouse 3T3L1 adipocytes) EC50 $\pm$ SEM
V76	13 $\pm$ 4 nM (n=5)	5 $\pm$ 1 nM (n=3)
V101	0.60 $\pm$ 0.06 nM (n=5)	0.60 $\pm$ 0.06 nM (n=3)
V103	0.9 $\pm$ 0.3 nM (n=5)	0.60 $\pm$ 0.07 nM (n=3)
V188	0.4 $\pm$ 0.1 nM (n=3)	0.48 $\pm$ 0.14 nM (n=3)

Example 4: *In vivo* Tests of FGF21 Variants

[000263] The *ob/ob* mouse is a mouse model for type 2 diabetes. The mice lack functional leptin and are characterized by hyperglycemia, insulin resistance, hyperphagia, hepatic steatosis and obesity. Male *ob/ob* mice (10-13 weeks old) were used to measure the effect on blood glucose of the following PEGylated FGF21 variant V76 and Fc-FGF21 fusion variants V101, V103 and V188.

[000264] FGF21 variants or PBS vehicle were administered s.c. at 1 mg/kg (V101, V103 and V188) or s.c at 5 mg/kg V76 twice per week 12 days (4 doses total). On the first day of the study, tail blood glucose and body weight were measured and mice were allocated into different groups (n=8 per group) with mean glucose and body weight matched among the groups. Blood glucose was measured using a glucometer (OneTouch). Plasma insulin was measured on day 1 before dosing and on day 12, 24 hours post the last dose. The results of these studies are summarized in Table 5.

[000265] The results of these studies are summarized in **Table 3** and **Figures 1-3**. Fc-FGF21 Fusion Variants V101, V103 and V188 are superior to PEGylated FGF21 Variant V76 on every endpoint measured in these studies and at a five-fold lower dose.

Table 3. % changes versus vehicle in plasma glucose, insulin, body weight (BW) gain, liver TG/lipid by FGF21 variants during 12-day studies in *ob/ob* mice.

Summary of 12-day treatment study in diabetic <i>ob/ob</i> mice (%change from vehicle)					
FGF21 Variant ID	Dose (mg/kg)	Total Glucose (AUC)	Plasma Insulin	Body Weight	Liver lipid
V76	5.0	-42%	-46%	-7%	-30%
V101	1.0	-53%	-82%	-12%	-44%
V103	1.0	-46%	-69%	-12%	-50%
V188	1.0	-42%	-59%	-11%	-51%

Example 5: Pharmacokinetics of FGF21 Fusion Variants in Mice

[000266] To determine the pharmacokinetic profile of Fc-FGF21 Fusion Variants V101, V103 and V188, C57BL/6J mice were injected IV with 1 mg/kg test article and bled at various time points out to 16 days (384 hours). Blood samples were collected into EDTA-coated microtainer tubes from either the submandibular or retro-orbital plexus. Approximately 50 μ L of blood was collected at each time point, yielding ~25 μ L of plasma.

[000267] To measure plasma concentrations of test articles by ELISA, 384-well plates were coated overnight at room temperature (RT) with 2 μ g/mL of anti-Human Fc-gamma

goat polyclonal antibody (30 μ L/well) and then blocked with a casein-based diluent for 2 hour at RT (100 μ L/well). Diluted samples, standards, and controls were added to the plate (30 μ L/well) and incubated for 2 hour at RT. After the samples were removed, the wells were washed 3 times with a phosphate-based wash solution (100 μ L/well). The detection antibody, an HRP-labeled version of the capture antibody, was added to the plate and incubated for 1 hour at RT (30 μ L/well). After the plate was again washed 3 times with a phosphate-based wash solution (100 μ L/well), a chemiluminescent substrate was added (30 μ L/well) and the plate luminescence was read within 5 minutes using an appropriate plate reader. As shown in Figures 4A and 4B the Fc-FGF21 fusion variants had a greatly extended plasma half-life relative to known Fc-FGF21 fusions in the art (Figure 4A) and relative to PEGylated FGF21 variant V76 (Figure 4B).

[000268] Serum levels of Fc-FGF21 test articles were validated by Western blot for comparison to levels measured by ELISA to ensure that full length Fc-FGF21 variant and not Fc alone was being detected in the ELISA. Two μ L of mouse serum was combined with 2.5 μ L of 4X loading buffer, 1 μ L of 10X denaturant and 4 μ L of dH₂O, heated to 95°C for 5 minutes and loaded onto a 4-12% gradient polyacrylamide gel and electrophoresed for 1 hour at 100 Volts (constant voltage). Samples were transferred to nitrocellulose filter paper by Western blot using the iblot system (Invitrogen, Cat. # IB1001, 7 minute run time). The nitrocellulose filters were blocked with 30 mL of Rockland blocking solution (Cat. #MB-070), probed following the snap iblot system protocol with a goat anti-FGF21 primary antibody at a 1:2000 dilution (R&D systems, Cat. # BAF2539) and fluorescently labeled streptavidin as a secondary at a 1:10000 dilution (Licor, Cat. # 926-68031). Protein levels were imaged on the Licor Odyssey system at 700 nm and compared with 2 nM control V101 run on the same gel. As shown in Figure 4C full-length Fc-FGF21 variants V101, V103 and V188 are detectible using a Western Blot using anti-FGF21 antibody out to 15 days from mouse serum from the pharmacokinetic study.

Example 6: Fc-FGF21 Fusion Variants V101, V103 and V188 are extremely thermodynamically stabile

[000269] Proteins can be unfolded at specific temperature range. The temperature of protein unfolding is an intrinsic parameter to describe thermal stability of proteins. Differential Scanning Calorimetry (DSC) is used to detect the unfolding temperature of protein. This characteristic temperature is described as melting temperature (T_m), which is the peak temperature during protein unfolding.

5 [000270] Original protein samples are diluted in PBS to a concentration of ~1mg/ml (0.5mg/ml to 1.2 mg/ml) for a total volume of 0.5ml. An aliquot of 0.4ml per well diluted protein sample, standard, PBS, and DI water are added to DSC 96-well plate. The plate is then covered by a seal. Samples were analyzed in a 96 well Differential Scanning Calorimeter from MicroCal. The temperature was scanned from 10 – 110 degrees C at a rate of 1 degree per minute.

10 [000271] As shown in Figure 4 D the melting temperatures of FGF21 variants V101, V103 and V188 are extremely high. This is in contrast to the lower melting temperatures of FGF21 variant V76 and wild-type FGF21 (not shown). We attribute the improved stability of V101, V103 and V188 to the specific addition of a second disulfide bond from the novel Q55C and G148C mutations. This type of thermodynamic stability is known to protect proteins from proteolysis and can in addition translate into significantly prolonged stability in vivo and the improved pharmacokinetic profiles exemplified by the data in Figures 4B and 4C.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A fusion protein comprising an FGF21 variant and an Fc region.
2. The fusion protein of claim 1, wherein the sequence of said protein is selected from a sequence listed in Table 1.

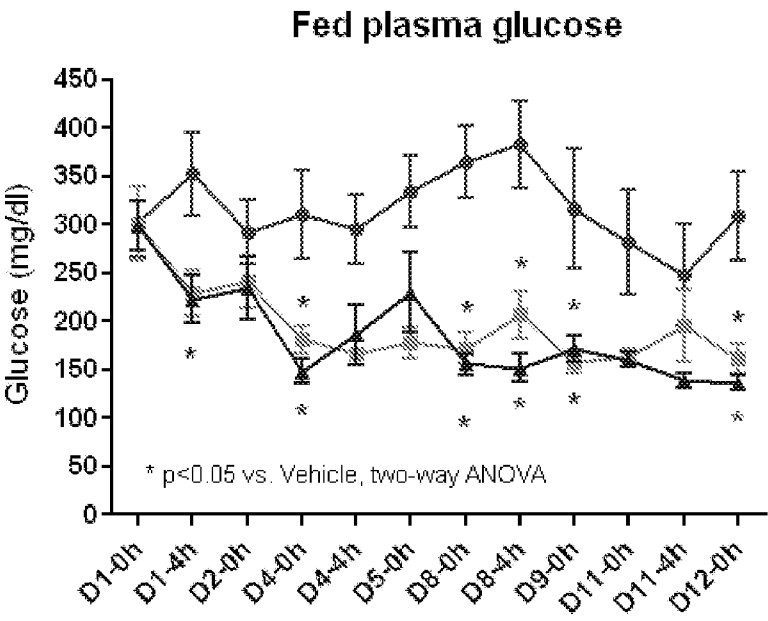


FIG 1A

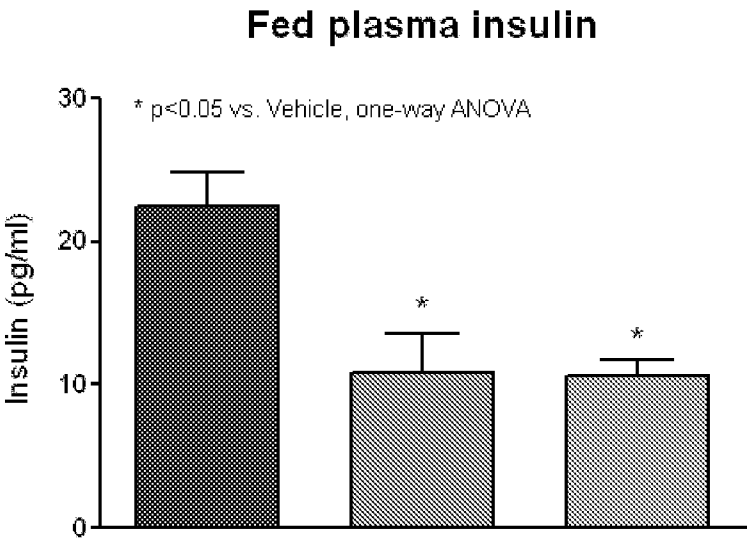


FIG 1B

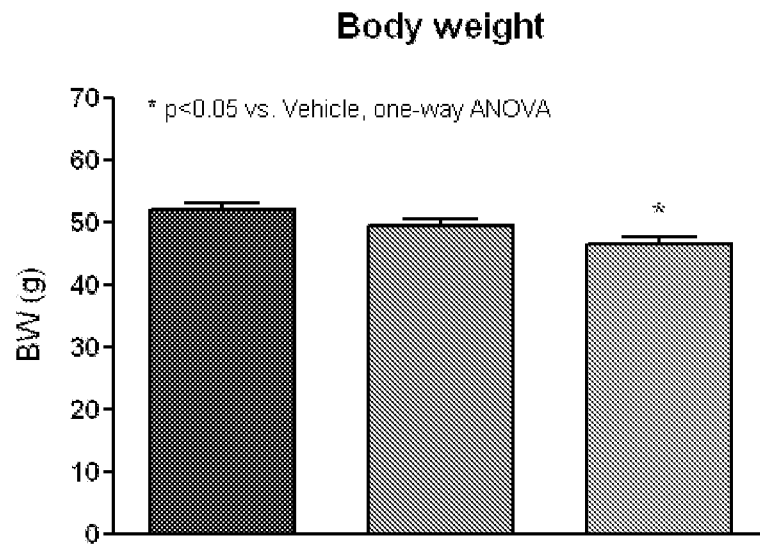


FIG 1C

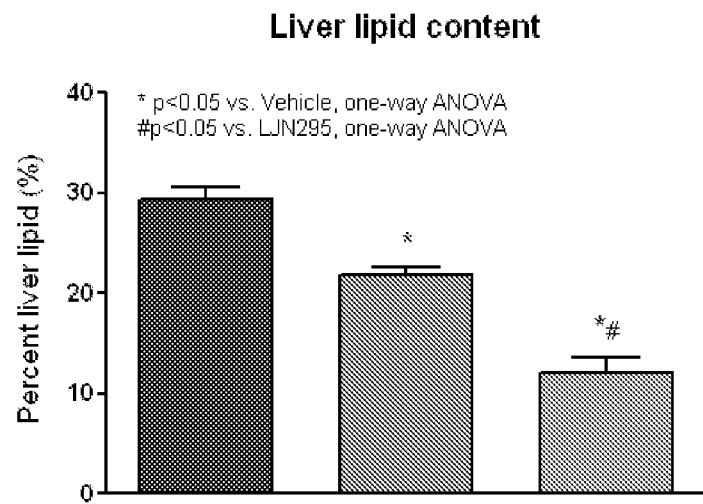


FIG 1D

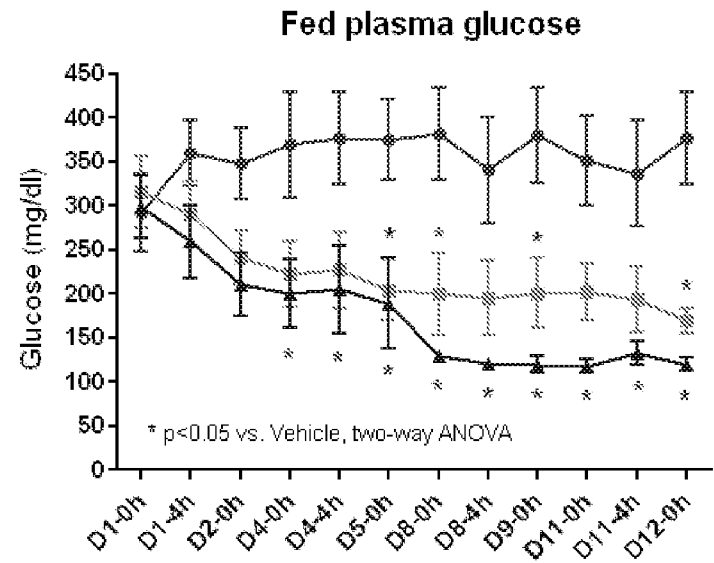


FIG 2A

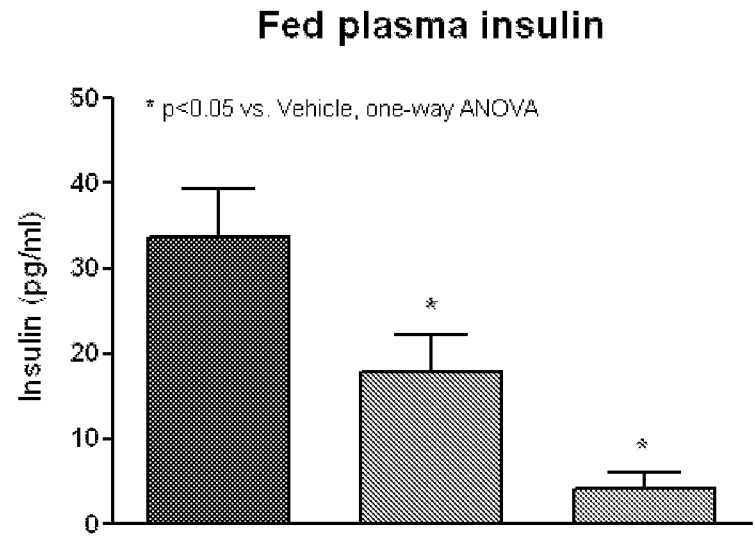


FIG 2B

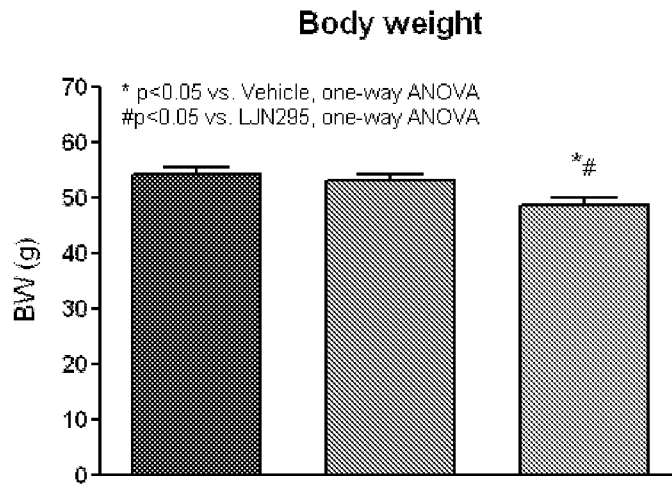


FIG 2C

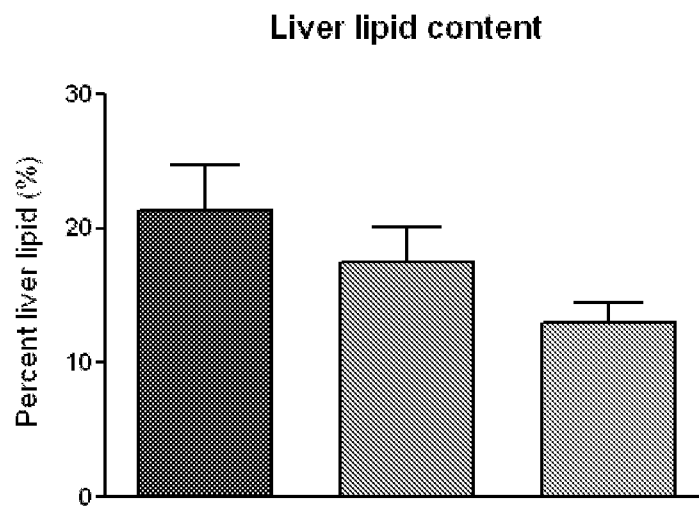


FIG 2D

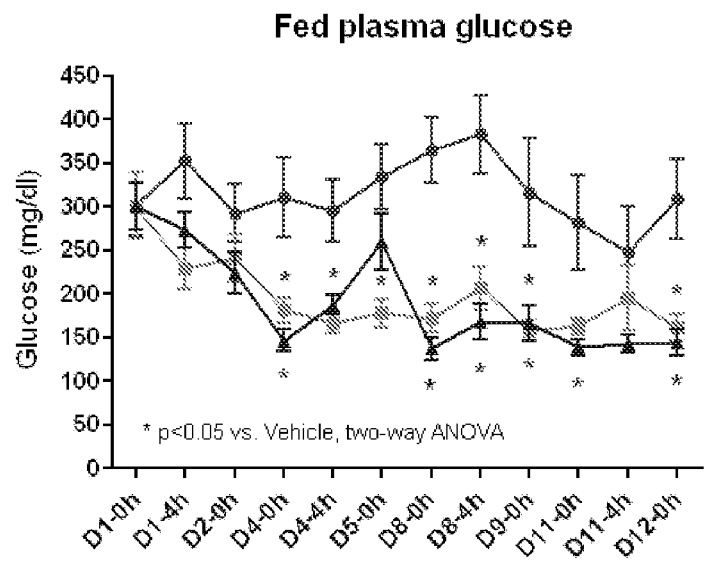


FIG 3A

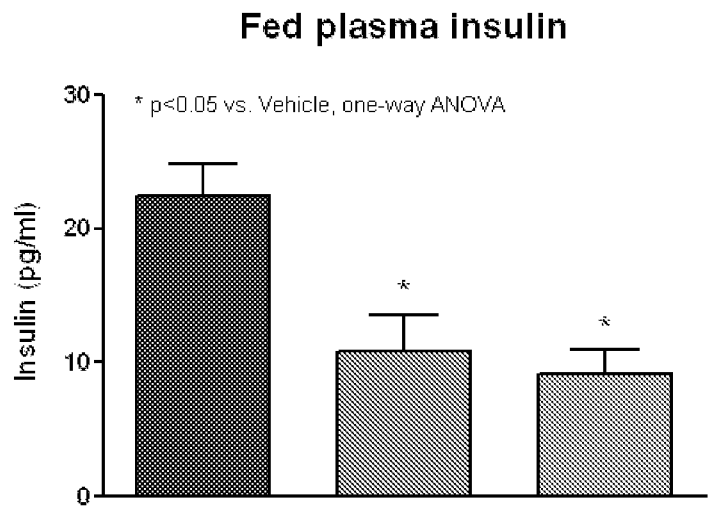


FIG 3B

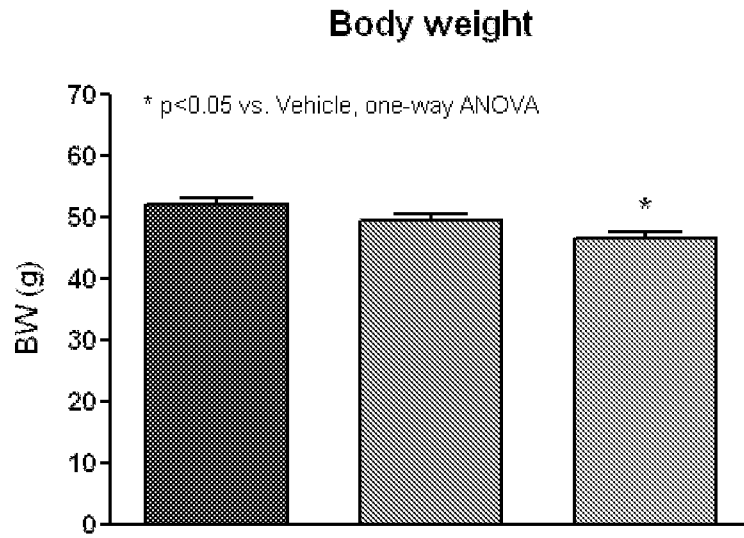


FIG 3C

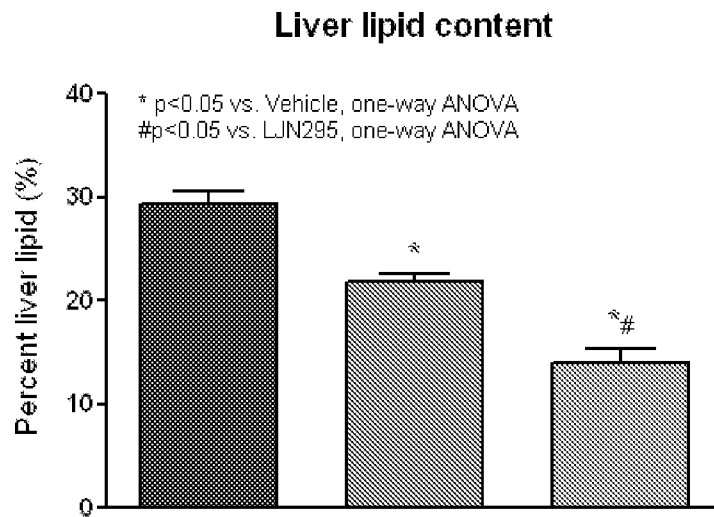


FIG 3D

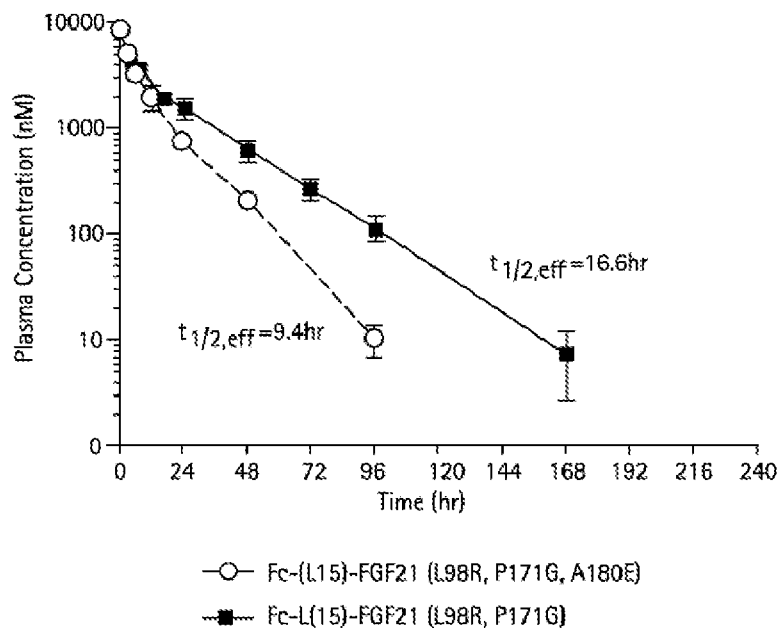


FIG 4A

Single dose mouse PK IV 1 mg/kg

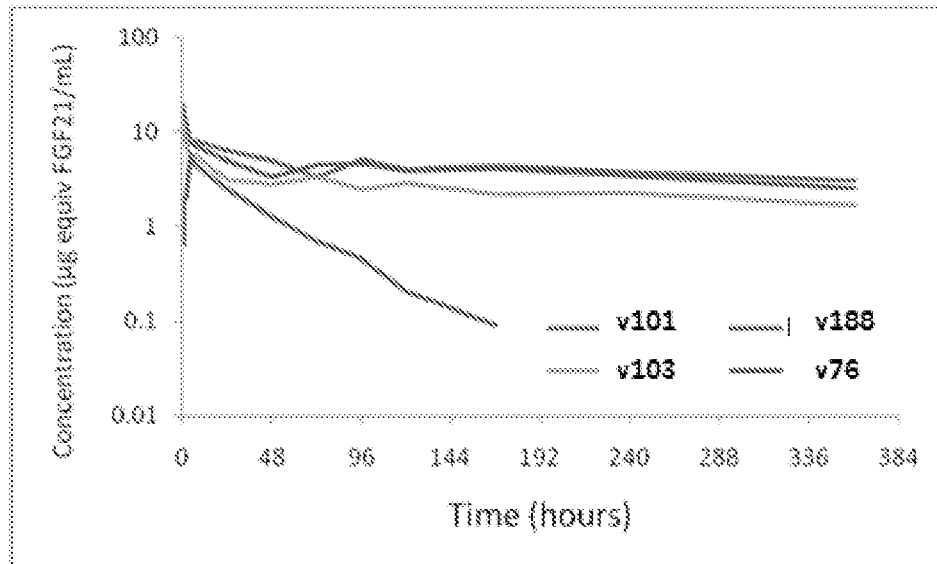


FIG 4B

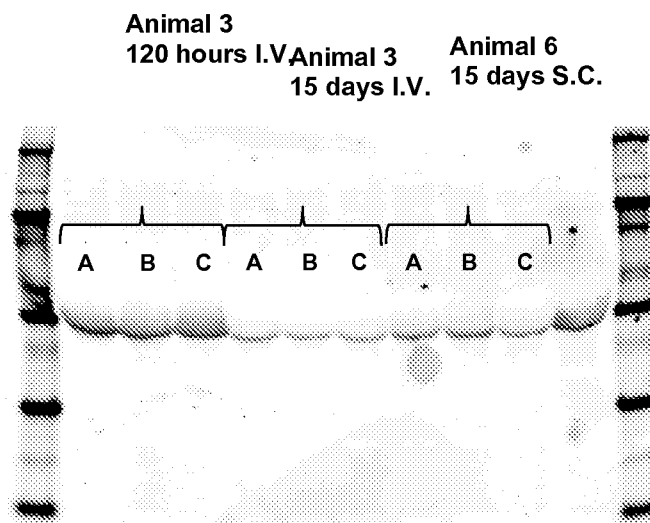


FIG 4C

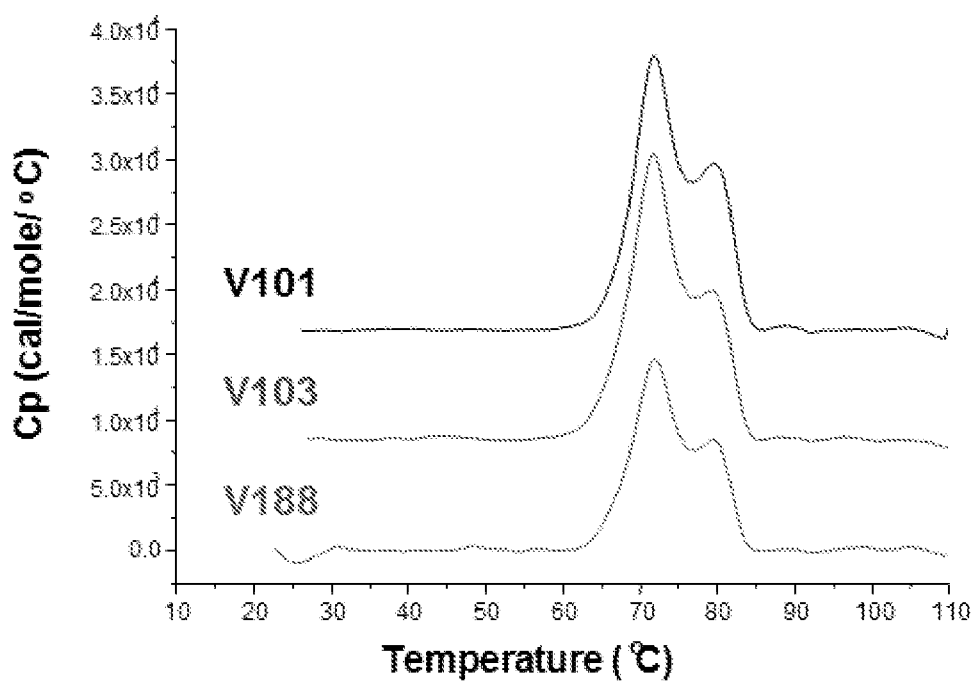


FIG4D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/057384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C07K14/50
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/129503 A1 (AMGEN INC [US]; BELOUSKI EDWARD JOHN [US]; ELLISON MURIELLE MARIE [US]) 11 November 2010 (2010-11-11) claims 1-67 examples 1-28 pages 32-34 sequence 107	1,2
X	WO 2010/129600 A2 (AMGEN INC [US]; BELOUSKI EDWARD JOHN [US]; ELLISON MURIELLE MARIE [US]) 11 November 2010 (2010-11-11) claims 1-31 pages 51-52 examples 1-28 sequence 107 ----- -/--	1,2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 December 2012

Date of mailing of the international search report

11/03/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Behrens, Joyce

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/057384

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/078463 A2 (LILLY CO ELI [US]; ETGEN GARRETT JAY JUNIOR [US]; KHARITONENKOV ALEXEI) 27 July 2006 (2006-07-27) sequence 1 claims 1-10 -----	1,2
A	KHARITONENKOV A ET AL: "FGF-21 as a novel metabolic regulator", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 115, no. 6, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 1627-1635, XP002362553, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI23606 abstract page 1629, column 1, lines 20-24 -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/057384

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010129503	A1	11-11-2010	AR 076541 A1 22-06-2011
		AU 2010246108 A1 24-11-2011	
		CA 2760196 A1 11-11-2010	
		CN 102655877 A 05-09-2012	
		CO 6470863 A2 29-06-2012	
		EA 201171220 A1 30-05-2012	
		EP 2427208 A1 14-03-2012	
		JP 2012525844 A 25-10-2012	
		KR 20120068764 A 27-06-2012	
		MA 33716 B1 01-11-2012	
		PE 03582012 A1 26-04-2012	
		SG 175861 A1 29-12-2011	
		TW 201105345 A 16-02-2011	
		US 2010285131 A1 11-11-2010	
		US 2012177646 A1 12-07-2012	
		US 2012178685 A1 12-07-2012	
		US 2012213779 A1 23-08-2012	
		UY 32607 A 31-12-2010	
		WO 2010129503 A1 11-11-2010	
WO 2010129600	A2	11-11-2010	AU 2010246038 A1 01-12-2011
		CA 2760674 A1 11-11-2010	
		EP 2427207 A2 14-03-2012	
		JP 2012525847 A 25-10-2012	
		US 2012052069 A1 01-03-2012	
		WO 2010129600 A2 11-11-2010	
WO 2006078463	A2	27-07-2006	EP 1846019 A2 24-10-2007
		JP 2008528487 A 31-07-2008	
		US 2008261875 A1 23-10-2008	
		WO 2006078463 A2 27-07-2006	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/057384

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see additional sheet(s)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 7.

2. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 8.

3. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 9.

4. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 10.

5. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 11.

6. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 12.

7. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 13.

PROTEÍNAS DE FUSIÓN PARA TRATAR TRASTORNOS METABÓLICOS

CAMPO DEL INVENTO

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a nuevas proteínas de fusión que comprenden el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) conocido por mejorar los perfiles metabólicos en sujetos en quienes se administren.

FUDAMENTO DEL INVENTO

- 10 **[0002]** La familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) se caracteriza por 22 ligandos homólogos genéticamente distintos, que se agrupan en siete subfamilias. El FGF-21 está más estrechamente relacionado con, y forma una subfamilia con el FGF-19 y el FGF-23. Esta subfamilia de FGF regula diversos procesos fisiológicos no comunes a los FGFs clásicos, a saber, la energía y la homeostasis de los ácidos biliares, el
- 15 metabolismo de la glucosa y de los lípidos y la homeostasis del fosfato como también la de la vitamina D. Además, a diferencia de los FGFs clásicos, esta subfamilia actúa de manera endocrina. (Moore, D.D. (2007) Science 316, 1436-8)(Beenken et al. (2009) Nature Reviews Drug Discovery 8, 235).

- [0003]** El FGF21 es un polipéptido de 209 aminoácidos que contiene una secuencia
- 20 líder de 28 aminoácidos (SEQ ID NO: 5). El FGF21 humano tiene una identidad aminoácida del 79% con el FGF21 de ratón y una identidad aminoácida del 80% con el FGF21 de rata. El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FG21) se ha descrito como un tratamiento para la enfermedad isquémica vascular, cicatrización de heridas y enfermedades asociadas con la pérdida de la función celular pulmonar, bronquial o
- 25 alveolar. (Nishimura et al. (2000) Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206; publicación de patente WO01/36640; y publicación de patente WO01/18172) A pesar de que el FGF-21 activa los receptores del FGF y moléculas de señalización corriente abajo, incluyendo FRS2a y ERK, no se ha detectado la interacción directa de FGFRs y el FGF-21. Estudios recientes han identificado β -Klotho, que es altamente expresado en el
- 30 hígado, adipocitos y en el páncreas, como factor determinante de la respuesta celular al FGF-21 y un co-factor que media señalización de FGF-21 a través de FGFRs (Kurosu, H. (2007) J Biol Chem 282, 26687-95). El FGF21 es un agonista potente de los complejos de señalización FGFR1(IIIc), FGFR2(IIIc) y FGFR3(IIIc) β -klotho .

- [0004] Se ha mostrado que FGF-21 induce la absorción de glucosa independiente de insulina. También se ha mostrado que el FGF-21 mejora la hiperglucemia en una amplia gama de modelos de roedores diabéticos. Además, los ratones transgénicos que sobre-expresan FGF-21 resultaron ser resistentes a anormalidades metabólicas inducidas por la dieta, incluyendo la disminución del peso corporal y la masa grasa, y aumentos en la sensibilidad a la insulina (Badman, MK . (2007) *Cell Metab* 5, 426-37). La administración del FGF-21 en primates no humanos diabéticos causó una disminución de los niveles de glucosa plasmática, triglicéridos, insulina y glucagón en ayunas, y dio lugar a mejoras significativas en los perfiles lipoproteicos incluyendo un aumento de cerca del 80% en colesterol HDL (Kharitononkov, A. (2007) *Endocrinology* 148, 774 a 81). Estudios recientes que investigan los mecanismos moleculares de acción de FGF21 han identificado al FGF21 como una hormona endocrina importante que ayuda a controlar la adaptación al estado en ayunas: (Cadigan et al. (2009) *Endocrinology* 150, 4931) (Inagaki et al. (2007) *Cell Metabolism* 5, 415). Esto proporciona un vínculo que faltaba, corriente abajo de PPAR α , mediante el cual el hígado se comunica con el resto del cuerpo en la regulación de la biología de la homeostasis energética. (Cadigan et al. (2008) *Cell Metabolism* 8, 169)(Lundasen et al. (2007) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, 437).
- [0005] FGF21 regula la homeostasis de adipocitos a través de la activación de una ruta AMPK/SIRT1/PGC1 α para inhibir la expresión de PPAR γ y aumentar la función mitocondrial. (Chau et al. (2010) *PNAS* 107, 12553) FGF21 también aumenta la absorción de glucosa por músculo esquelético en miotúbulos humanos cultivados y tejido de ratón aislado. El tratamiento con FGF21 de células de islotes de roedores conduce a unión y supervivencia mejoradas a través de la activación de las rutas ERK1/2 y Akt. (Wente et al. (2006) *Diabetes* 55, 2470) El tratamiento con FGF21 también resulta en expresión génica alterada para la lipogénesis y enzimas de oxidación de ácidos grasos en hígados de roedores, probablemente a través de señalización de HNF4 α y Foxa2.
- [0006] Una dificultad asociada con el uso del FGF-21 directamente como un bioterapéutico es que su vida media es muy corta. (Kharitononkov, A. et al. (2005) *Journal of Clinical Investigation* 115:1627-1635). En ratones, la vida media del FGF21 humano es de 0,5 a 1 hora, y en monos cyno, la vida media es de 2 a 3 horas. El FGF21 puede utilizarse como una formulación farmacéutica estéril multi-uso. Sin embargo, se ha determinado que los preservativos, es decir, m-cresol, tienen un efecto adverso en la estabilidad en estas condiciones.

[0007] En el desarrollo de una proteína de FGF21 para su uso como agente terapéutico en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 y otros trastornos metabólicos, un aumento en la vida media y en la estabilidad sería deseable. Las proteínas del FGF21 que tienen una vida media y una estabilidad aumentada permitirían una dosificación
5 menos frecuente en los pacientes a quienes se administró la proteína. Claramente, hay una necesidad de desarrollar una formulación proteica estable acuosa para el FGF21 proteico terapéutico.

[0008] Además, un reto importante en el desarrollo del FGF21 como producto farmacéutico, es hacer frente a su inestabilidad física y química. La variedad de
10 composición y características de las proteínas definen los comportamientos específicos tales como dobleces, estabilidad conformacional, y desdoblamiento/desnaturalizaciones. Estas características se deben abordar para estabilizar las proteínas en el desarrollo de las condiciones de formulación farmacéutica que utilizan soluciones acuosas de proteínas (Wang, W., int. J. of Pharmaceutics, 18, (1999)). Un efecto deseado de la estabilización
15 de proteínas terapéuticas de interés, por ejemplo, las proteínas de la presente invención, es la resistencia creciente a la proteólisis y a la degradación enzimática, mejorando así la estabilidad de las proteínas y reduciendo la agregación de proteínas.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0009] La invención se refiere a la identificación de nuevas proteínas de fusión que
20 comprenden el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) y que tienen propiedades farmacéuticas mejoradas sobre el FGF21 tipo silvestre y variantes de las mismas bajo condiciones de formulación farmacéutica ej., son más estables, poseen la capacidad de mejorar los parámetros metabólicos de sujetos a quienes se administran, y
25 son menos susceptibles a proteólisis y degradación enzimática, y son menos propensas a agregar y formar complejos. Las proteínas de fusión de la invención comprenden truncamientos, mutaciones y variantes del FGF21.

[00010] También se divulgan métodos para el tratamiento de trastornos asociados con el FGF21, así como otros trastornos metabólicos, endocrinos y cardiovasculares, tales como
30 la obesidad, diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, infarto agudo del miocardio, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, accidente cerebro-vascular, insuficiencia

cardiaca, enfermedad cardiaca coronaria, enfermedad renal, complicaciones diabéticas, neuropatía, gastroparesia, trastornos asociados con severas mutaciones inactivadoras en el receptor de la insulina y otros trastornos metabólicos, y en la reducción de la mortalidad y la morbilidad de los pacientes críticos.

- 5 **[00011]** Las proteínas de fusión de la presente invención pueden utilizarse una vez a la semana de manera inyectable ya sea solas o en combinación con agentes antidiabéticos orales que mejoran el control de la glucemia, el peso corporal y el perfil lipídico de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. Las proteínas también pueden ser utilizadas para el tratamiento de la obesidad u otras condiciones asociadas con el FGF21.
- 10 **[00012]** Las proteínas de fusión de la invención superan los obstáculos significativos de inestabilidades físicas asociadas con terapéuticos de proteína, incluyendo, por ejemplo, con la administración del FGF21 tipo silvestre, mediante la presentación de las proteínas que son más estables, menos susceptibles a la proteólisis y la degradación enzimática, y menos probables de agregarse y formar complejos, que el FGF21 tipo silvestres en
- 15 condiciones de la formulación farmacéutica.
- [00013]** En un primer aspecto, la invención proporciona proteínas de fusión del Factor de Crecimiento Fibroblástico 21 (FGF21) que comprenden una o más de las secuencias enumeradas en la Tabla 1, y se describe adicionalmente en la presente. Las secuencias FGF21 enumeradas en la Tabla 1 pueden ser variantes de la secuencia de FGF21 tipo
- 20 silvestre, por ejemplo, la secuencia de FGF21 tipo silvestre con número de referencia NCBI NP_061986.1, y encontrada en tales patentes concedidas como, por ejemplo, US 6.716.626 B1, concedida a Chiron Corporation.
- [00014]** Dichas fusiones pueden ser, por ejemplo, entre las secuencias de FGF21 variante, por ejemplo, las secuencias de la Tabla 1, y otras moléculas (una porción no
- 25 FGF21), por ejemplo, un dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), Albúmina de Suero Bovino (HSA), o polipéptidos fijadores de albúmina. En una realización preferida, la porción no FGF21 de la molécula es una región Fc.
- [00015]** Otras realizaciones están relacionadas con polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la invención, un vector que contiene dichos polinucleótidos y una
- 30 célula huésped que lleva dicho vector.
- [00016]** Se proporcionan en la presente métodos para generar las proteínas de fusión de la invención, en donde tales métodos implican la modificación de la proteína FGF21 tipo silvestre, a través de por ejemplo, la incorporación específica a sitio de aminoácidos en la posiciones de interés dentro de la proteína FGF21 tipo silvestre, así como la fusión entre

la porción FGF21 de la molécula a otras moléculas, ej., un dominio IgG constante o fragmento del mismo (ej., la región Fc), Albúmina de Suero Humano (HSA), o polipéptidos de unión de albúmina. Dichas modificaciones y fusiones mejoran las propiedades biológicas de las proteínas de fusión de la invención en relación con las versiones tipo silvestre de las proteínas así como, en algunos casos, sirven como puntos de fijación para, por ejemplo, las etiquetas y los agentes de extensión de vida media proteica, y para fines de fijar dichas variantes a la superficie de un soporte sólido. Las realizaciones afines de la invención son los métodos de producir células capaces de producir dichas proteínas de la invención, y de la producción de vectores que contengan ADN que codifique dichas variantes y fusiones.

[00017] En varias realizaciones, las proteínas de fusión de la invención divulgadas en la presente pueden comprender uno o más fragmentos de las secuencias tipo silvestre de FGF21, incluyendo fragmentos tan pequeños como residuos de 8-12 aminoácidos de longitud, y en donde el polipéptido es capaz de reducir la glucosa en sangre en un mamífero. En varias realizaciones, las proteínas de fusión de la invención divulgadas en la presente pueden comprender una o más variantes de la secuencia de FGF21 tipo silvestre, ej., con una o más entre supresión, inserción, adición, o sustitución de aminoácidos con relación a las secuencias tipo silvestre de los mismos.

[00018] En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de la invención divulgada en la presente pueden unirse covalentemente a uno o más polímeros, tales como el polietilenglicol (PEG) o el ácido polisialico, ya sea en la posición de modificaciones aminoácidas sitio-específicas hechas en relación con el FGF21 tipo silvestre, o en la posición de los aminoácidos comúnmente compartidos con las versiones tipo silvestre de estas proteínas. El grupo PEG es fijado en tal forma para aumentar, y/o no interferir con la función biológica de las porciones constituyentes de las proteínas de fusión de la invención, por ejemplo, las variantes proteicas de FGF21. En otras realizaciones, los polipéptidos del invento pueden ser fusionados a una secuencia aminoácida heteróloga, opcionalmente mediante un enlazador, tal como GS o GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6) La secuencia aminoácida heteróloga puede ser un dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), Albúmina de Suero Humano (ASH), o polipéptidos fijadores de albúmina. Tales proteínas de fusión descritas en este documento también pueden formar multímeros.

[00019] En algunas realizaciones, la secuencia aminoácida heteróloga (por ejemplo, ASH, Fc, etc) se fusiona con el terminal amino de las proteínas de fusión de la invención.

En otras realizaciones, la secuencia aminoácida heteróloga de fusión (por ejemplo, ASH, Fc, etc) se fusiona con el terminal carboxilo de las proteínas de fusión de la invención.

[00020] Sin embargo, otra realización se relaciona con métodos para tratar a un paciente que exhibe uno o más trastornos asociados con el FGF21, como la obesidad, diabetes mellitus tipo 2, diabetes mellitus tipo 1, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad hepática grasa no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, hipertensión, enfermedad cardiovascular, arteriosclerosis, enfermedad arterial periférica, accidente cerebro vascular, insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria, enfermedad renal, complicaciones de la diabetes, neuropatía, gastroparesia y otros trastornos metabólicos, los cuales comprenden administrar en dicho paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más proteínas de la invención o una composición farmacéutica de las mismas.

[00021] La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión de la invención divulgadas en la presente y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas se pueden utilizar en un método para tratar un trastorno metabólico, y el método comprende administrar a un paciente humano que lo necesite, una composición farmacéutica del invento. Los ejemplos no limitantes de trastornos metabólicos que pueden ser tratados incluyen la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 y la obesidad.

[00022] Estos y otros aspectos del invento se explicarán en la siguiente descripción detallada del invento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[00023] Las figuras 1A-1D muestran que V188 tiene eficacia mejorada en el modelo de ratones diabéticos ob/ob sobre V76. V188 muestra resultados superiores cuando se administra a 1 miligramo por kilogramo (mpk), en comparación con los 5 miligramos por kilogramos a los cuales se administra V76. La Figura 1A muestra la glucosa plasmática absorbida como una lectura (los círculos representan vehículo (PBS – solución salina amortiguada por fosfato), los cuadrados representan V76 a 5 mpk, y los triángulos representan V188 a 1 mpk. La Figura 1B muestra la insulina plasmática absorbida como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 a 5 mpk, y V188 a 1 mpk). La Figura 1C muestra el peso corporal como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 a 5 mpk, y V188 a 1 mpk). La Figura 1D muestra el contenido de lípidos

del hígado como una lectura de izquierda a derecha: vehículo, V76 a 5 mpk, y V188 a 1 mpk).

[00024] Las figuras 2A-1D muestran que V101 tiene eficacia mejorada en el modelo de ratones diabéticos ob/ob sobre V76. V101 muestra resultados superiores cuando se administra a 1 miligramo por kilogramo (mpk), en comparación con los 5 miligramos por kilogramos a los cuales se administra V76. La Figura 2A muestra la glucosa plasmática absorbida como una lectura (los círculos represente vehículo (PBS – solución salina amortiguada por fosfato), los cuadrados representan V76 a 5 mpk, y los triángulos representan V101 a 1 mpk. La Figura 2B muestra la insulina plasmática absorbida como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 a 5 mpk, y V101 a 1 mpk). La Figura 2C muestra el peso corporal como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 a 5 mpk, y V101 a 1 mpk). La Figura 2D muestra el contenido de lípidos del hígado como una lectura de izquierda a derecha: vehículo, V76 a 5 mpk, y V101 a 1 mpk).

[00025] Las figuras 3A-3D muestran que V103 tiene eficacia mejorada en el modelo de ratones diabéticos ob/ob sobre V76. V103 muestra resultados superiores cuando se administra a 1 miligramo por kilogramo (mpk), en comparación con los 5 miligramos por kilogramos a los cuales se administra V76. La Figura 3A muestra la glucosa plasmática absorbida como una lectura (los círculos representan vehículo (PBS – solución salina amortiguada por fosfato), los cuadrados representan V76 a 5 mpk, y los triángulos representan V101 a 1 mpk. La Figura 3B muestra la insulina plasmática absorbida como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 a 5 mpk, y V103 a 1 mpk). La Figura 3C muestra el peso corporal como una lectura (de izquierda a derecha: vehículo, V76 a 5 mpk, y V103 a 1 mpk). La Figura 3D muestra el contenido de lípidos del hígado como una lectura de izquierda a derecha: vehículo, V76 a 5 mpk, y V103 a 1 mpk).

[00026] Las Figuras 4A-4D muestran propiedades farmacocinéticas y termodinámicas superiores poseídas por las proteínas de fusión de la invención sobre las proteínas de fusión FGF21 en la técnica. La figura 4A muestra las concentraciones plasmáticas de las proteínas de fusión de la invención en la Publicación PCT WO10/129600 descrita como Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G) y Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E), seguido de la inyección intravenosa de dicha fusión en ratones. La figura 4B muestra las propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión de la invención (V101, V103 y V188) después de una dosis intravenosa única en el ratón después de una prueba ELISA anti-Fc en comparación con los datos farmacocinéticos generados en el ratón para V76

en un estudio anterior utilizando un anticuerpo anti-FGF21 ELISA. La Figura 4C muestra una revisión puntual de las proteínas de fusión de la invención en un ensayo western blot anti-FGF21, consistentes con datos anti-Fc-ELISA a 120 horas y 15 días. Las muestras transferidas son las siguientes: A representa V101, B representa V103, y C representa V188. Control es V101 y suero. La Figura 4D demuestra la estabilidad termodinámica significativamente aumentada de las proteínas de fusión de la invención en comparación con V76. Desde arriba a abajo, la figura representa V101, V103, y V188, todos los cuales tienen temperaturas de fusión mejoradas (T_m) en comparación con V76 ($T_m < 50^\circ\text{C}$ (no se muestra)) y FGF21 tipo silvestre ($T_m = 46.5^\circ\text{C} \pm 0.3$ (no se muestra)).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[00027] Las proteínas de fusión de la presente invención representan versiones modificadas del polipéptido FGF21 tipo silvestre de longitud completa, como se conoce en el estado de la técnica. La secuencia FGF21 tipo silvestre servirá como una secuencia de referencia (SEQ ID NO: 1), por ejemplo, cuando las comparaciones entre la secuencia FGF21 tipo silvestre y los variantes proteicos son necesarios. La secuencia FGF21 tipo silvestre tiene un número NCBI de secuencia de referencia NP_061986.1, y se puede encontrar en tales patentes concedidas como, por ejemplo, EE.UU. 6,716,626 B1, asignada Chiron Corporation (SEQ ID NO:1).

	Met	Asp	Ser	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Glu	His	Ser	Gly	Leu	Trp	Val	Ser
	1		5			10			15							
25	Val	Leu	Ala	Gly	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								
	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ile	Arg
		50			55			60								
30	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
35			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								
40	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 Leu Pro Glu
 165 170 175
 Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
 180 185 190
 5 Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 195 200 205
 Ser
 209

- 10 **[00028]** La secuencia correspondiente de ARNc que codifica el polipéptido de FGF21 de longitud completa (número NCBI de referencia de secuencia NM_019113.2) se muestra a continuación (SEQ ID NO:2)

1 ctgtcagctg aggatccagc cgaaagagga gccaggcact caggccacct gagtctactc
 15 61 acctggacaa ctggaatctg gcaccaattc taaaccactc agcttctccg agctcacacc
 121 ccggagatca cctgaggacc cgagccattg atggactcgg acgagaccgg gtctgagcac
 181 tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc
 241 atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac
 301 acagatgatg cccagcagac agaagccac ctggagatca gggaggatgg gacgggtggg
 20 361 ggcgctgctg accagagccc cgaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt
 421 attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg ttctgtgcc agcgccaga tggggccctg
 481 tatggatcgc tccacttga ccctgaggcc tgcagcttc gggagctgct tcttggaggac
 541 ggatacaatg ttaccagtc cgaagccac ggctccccgc tgcacctgcc agggaacaag
 601 tccccacacc gggaccctgc accccgagga ccagctcgt tctgccaact accaggcctg
 25 661 cccccgcac tcccgagcc acccggaatc ctggccccc agcccccca tgtgggctcc
 721 tcggaccctc tgagcatggt gggaccttc cagggccgaa gcccagcta cgcttctga
 781 agccagagge tgtttactat gacatctct cttatttat taggttatt atcttattta
 841 ttttttatt ttcttactt gagataataa agagtccag aggagaaaaa aaaaaaaaaa
 901 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

30

- [00029]** La secuencia madura FGF21 carece de una secuencia líder y también puede incluir otras modificaciones de un polipéptido como el procesamiento proteolítico del extremo amino (con o sin una secuencia líder) y/o el extremo carboxilo, la escisión de un polipéptido más pequeño desde un precursor más grande, glicosilación ligada a N y/o ligada a O, y otras modificaciones post-translacionales entendidas por los expertos en el estado de la técnica. Un ejemplo representativo de una secuencia madura FGF21 tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 3, la cual representa las posiciones aminoácidas 29-209 de la secuencia proteica de FGF21 de longitud completa (número NCBI de referencia de secuencia NP_061986.1)):

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 5 10 15
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg
 Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 5 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
 10 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
 15 100 105 110
 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
 20 Ala Leu 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
 25 180

[00030] La secuencia de ADNc que codifica para el polipéptido maduro FGF21 (SEQ ID NO: 3) se muestra a continuación (SEQ ID NO: 4):

1 caccceatcc ctgactccag tcctctctcg caattcgggg gccaaagtccg gcagcgggtac
 30 61 ctctacACAG atgatgccca gcagacagaa gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg
 121 gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctctgc agctgaaagc cttgaagccg
 181 ggagttATTC aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg
 240 gccctgtatg gatcgctcca cttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt
 301 gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg
 35 360 aacaagTCCC cacaccggga cctgcaccc cgaggaccag ctgcttctt gccactacca
 421 ggctgcccc ccgactccc ggagccaccc ggaatcttg cccccagcc cccgatgtg
 481 ggctctctcg accctctgag catggtggga ccttccagg gccgaagccc cagctacgct
 541 tcctga
 40

[00031] Las proteínas de fusión de la invención pueden comprender variantes proteicas o mutantes de las proteínas tipo silvestre listadas en la presente, por ejemplo, las variantes de FGF21. Como se utilizan en la presente, los términos “variante de

proteína”, “polipéptido o variante de proteína,” “variant”, “mutante,” así como cualquier término similar o versiones específicas de los mismos (por ejemplo, "variante de proteína de FGF21," "variante," "variante," "mutante FGF21," etc) definen secuencias de proteínas o polipéptidos que comprenden modificaciones, truncamientos, otras variantes de las

5 contrapartes de proteínas o polipéptidos de ocurrencia natural *es decir, tipo silvestre) o secuencias nativas correspondientes. “FGF21 variante” o “mutante de FGF21,” por ejemplo, se describe con relación a la proteína FGF21 tipo silvestre (es decir, de ocurrencia natural) como se describe en la presente.

[00032] Las secuencias de proteínas de fusión representativas de la invención se listan

10 en la Tabla 1. Las descripciones de dichas funciones incluyen la variante FGF21 y, donde es aplicable, un enlazador. Los cambios o sustituciones empleados por la variante FGF21 se enumeran y describen con relación a FGF21 tipo silvestre. A manera de ejemplo, “Variante (V101)” (SEQ ID NO:10) es una fusión Fc-FCF21 con un enlazador de dos aminoácidos y las siguientes sustituciones se hacen con relación a

15 FGF21 tipo silvestre: Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, P174L, S195A, P199G, G202A.

TABLA 1 Proteínas de Fusión Fc Variante de FGF21

SEC ID NO:	Secuencia	Nombre*
7	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK <u>GSD</u> SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD AQQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGALYGS LHFDPEACSF RELLLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPGNKSPH RDPAPRGPARG FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LSMVGPSQGR SPSYAS	Fusión Fc N-terminal de longitud completa con enlazador 2 AA (GS) y WT FGF21
8	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK <u>GGG GSGGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDAQQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGA YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL	Fusión Fc N-terminal de longitud completa con enlazador 15 AA (GGGS x 3) entre Fc y WT FGF21

	PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS	
9	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQETEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Variante #76 = Proteína con 9 mutaciones totales con relación a FGF21 tipo silvestre (como en WO01/018172)
10	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSD SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGTLYGS LHFDPEACSF RELLLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LAMVGGSQAR SPSYAS	Variante # 101 = Fusión Fc N- terminal con el enlazador 2 AA (GS)entre Fc y FGF21= (Q55C,A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
11	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSD SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QKPDGALYGS LHFDPEACSF	Variante # 103 = Fusión Fc N- terminal con el enlazador 2 AA (GS) = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

	RELLLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LAMVGGSQAR SPSYAS	
12	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQKPDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPCNR SPHRDPASRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGGG QARSPSYAS	Variante # 188 = V103 con el enlazador 15 AA (GGGGG X 3)entre Fc y FGF21 = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
13	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS <u>LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGT YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPCNR SPHRDPASRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGGG QARSPSYAS	Variante # 204 = Fusión Fc N- terminal con el enlazador 15 AA (GGGGG x 3)entre Fc y FGF21= (Q55C,A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

[00033] *-Tenga en cuenta que la secuencia FGF21 tipo salvaje en esta tabla se refiere al número de secuencia de referencia NCBI NP_061986.1 (SEQ ID NO: 1) a menos que se indique lo contrario.

Todas las mutaciones en la fracción FgF21 y la numeración de aminoácidos

- 5 correspondiente de dichas mutaciones se refiere de nuevo a (SEC ID NO:1) no a las secuencias de longitud completa en esta tabla que también puede incluir regiones Fc y de enlazador.

- [00034]** Las variantes o mutantes utilizados en las proteínas de fusión de la invención, por ejemplo variantes de FGF21 tipo silvestre, presentan al menos un aminoácido sustituido, agregado, y/o retirado con relación a la proteína tipo silvestre. Además, los variantes pueden incluir truncamientos N- y/o C-terminales en relación con las proteínas tipo silvestre. En términos generales, un variante posee alguna propiedad modificada, estructural o funcional de la proteína tipo silvestre. Por ejemplo, el variante puede tener
- 10 estabilidad física aumentada o mejorada en soluciones concentradas (por ejemplo, agregación mediada menos hidrofóbica), estabilidad plasmática aumentada o mejorada cuando se incuba con el plasma de la sangre o bioactividad mejorada o aumentada mientras se mantiene un perfil de bioactividad favorable.

- [00035]** Sustituciones y modificaciones aminoácidas aceptables que constituyen diferencias entre las porciones de las proteínas de fusión de la invención y sus proteínas comparadoras tipo silvestre incluyen, pero no se limitan a, una o más sustituciones aminoácidas, incluyendo las sustituciones con análogos aminoácidos de origen no natural, y truncamientos. Por lo tanto, las proteínas de fusión de la invención (ej., las proteínas de fusión de la invención) incluyen, pero no se limitan a, mutantes dirigidos a
- 20 sitio, polipéptidos truncados, mutantes resistentes a proteólisis, mutantes reductores de agregación, mutantes de combinación, y proteínas de fusión, como se describen en la presente.

- [00036]** El experto en el estado de la técnica de expresión de proteínas reconocerá que la secuencia de metionina o metionina-arginina puede ser introducida en el extremo N de cualquiera de las proteínas de fusión de la invención, para expresión en *E. coli*, y se
- 30 contemplan dentro del contexto de este invento.

[00037] Las proteínas de fusión de la invención pueden poseer una mayor compatibilidad con conservantes farmacéuticos (por ejemplo, m-cresol, fenol, alcohol bencílico), lo que permite la preparación de una formulación farmacéutica conservada

que mantiene las propiedades físico-químicas y actividad biológica de la proteína durante el almacenamiento. En consecuencia, los variantes con estabilidad farmacéutica aumentada con relación al tipo silvestre, tienen estabilidad física mejorada en soluciones concentradas, bajo condiciones fisiológicas y conservadas de la formulación farmacéutica, mientras se mantiene la potencia biológica. A modo de ejemplo no limitante, las proteínas de fusión de la invención pueden ser más resistentes a la proteólisis y la degradación enzimática, pueden tener una mayor estabilidad, y pueden ser menos propensas a agregarse, que sus homólogos de tipo silvestre o la correspondiente secuencia nativa. Como se utilizan en la presente, estos términos no son mutuamente excluyentes o limitantes, siendo muy posible que un variante determinado tenga una o más propiedades modificadas de la proteína tipo silvestre.

[00038] La invención también incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión de la invención, que comprenden, por ejemplo, una secuencia aminoácida de FGF21 que es al menos 95% idéntica a la secuencia aminoácida de SEQ ID NO:3, pero en donde los residuos específicos que confieren una propiedad deseable a la variante de proteína FGF21, por ejemplo potencia mejorada a receptores FGF21, resistencia a proteólisis, vida media aumentada ó propiedades reductoras de agregación y combinaciones de las mismas, no se han modificado adicionalmente. En otras palabras, con la excepción de los residuos en la secuencia mutante de FGF21 que han sido modificados con el fin de conferir resistencia a la proteólisis-, reducción de la agregación, u otras propiedades, alrededor del 5% (alternativamente 4%, alternativamente 3%, alternativamente 2%, alternativamente 1%) de todos los demás residuos aminoácidos en la secuencia mutante FGF21 pueden ser modificados. Tales mutantes de FGF21 poseen al menos una actividad del polipéptido FGF21 de tipo silvestre.

[00039] El invento también comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleótida que es al menos 85% idéntica, y más preferiblemente, al menos 90 a 95% idéntica a la secuencia nucleótida de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:4, pero en donde los nucleótidos que codifican los residuos aminoácidos que confieren a la proteína la resistencia a proteólisis, reducción de agregación u otras propiedades, no se han modificado adicionalmente. En otras palabras, con la excepción de los nucleótidos que codifican los residuos en las secuencias mutantes de FGF21 que han sido modificados con el fin de conferir las propiedades de resistencia a la proteólisis, reducción de la agregación, u otras propiedades, alrededor de 15%, y más

preferiblemente entre 10 y 5% aproximadamente de todos los nucleótidos en la secuencia mutante, pueden ser modificados. Tales moléculas de ácido nucleico codifican proteínas que poseen al menos una actividad de sus contrapartes tipo silvestre.

[00040] Se proporcionan en la presente métodos para generar las proteínas de fusión de la invención, en donde tales métodos involucran modificación específica a sitio y modificación no específica a sitio de las versiones tipo silvestre de las proteínas (ej., la proteína tipo silvestre FGF21 descrita en la presente), por ejemplo, truncamientos de las proteínas tipo silvestre, y la incorporación específica a sitio de los aminoácidos en las posiciones de interés dentro de las proteínas tipo silvestre. Dichas modificaciones mejoran las propiedades biológicas de las proteínas de fusión de la invención en relación con las proteínas tipo silvestre, así como, en algunos casos, sirven como puntos de fijación para, por ejemplo, las etiquetas y los agentes de extensión de vida media proteica, y para fines de fijar dichos variantes a la superficie de un soporte sólido. Las realizaciones afines del invento son métodos para producir células capaces de producir dichas proteínas de fusión de la invención, y de la producción de vectores que contienen el ADN que codifica dichos variantes.

[00041] En ciertas realizaciones, tales modificaciones, por ejemplo modificaciones específicas a sitio, se utilizan para fijar conjugados, ej., grupos PEG a proteínas, polipéptidos, y/o péptidos de la invención, para fines de por ejemplos extender la vida media o de otra manera mejorar las propiedades biológicas de dichas proteínas, polipéptidos, y/o péptidos. Dichas técnicas se describen adicionalmente en la presente.

[00042] En otras realizaciones, tales modificaciones, ej., las modificaciones específicas a sitios se utilizan para fijar otros polímeros, moléculas pequeñas y secuencias de proteínas recombinantes que extienden la vida media de la proteína de la invención. Tal realización incluye la fijación de ácidos grasos o compuestos de fijación de albúmina a proteínas, polipéptidos, y/o péptidos. En otras realizaciones, las modificaciones se hacen en un tipo de aminoácido particular y pueden fijarse en uno o más sitios sobre la proteína.

[00043] En otras realizaciones, tales modificaciones, por ejemplo, modificaciones específicas a sitio se utilizan como elementos de fijación para la producción de multímeros de tipo silvestre y/o variantes, por ejemplo, dímeros (homodímeros o heterodímeros) o trímeros o tetradímeros.. Estas moléculas de proteínas multiméricas, pueden además tener grupos tales como PEG, azúcares y/o conjugados PEG-colesterol

fijados o a ser fusionados ya sea de manera amino-terminal o carboxi-terminal con otras proteínas, tales como Fc, Albúmina de Suero Humano (HSA), etc.

[00044] En otras realizaciones, tales modificaciones específicas a sitio se utilizan para producir proteínas, polipéptidos y/o péptidos en donde la posición de la pirrolisina o
5 análogo de pirrolisina específicamente incorporada a sitio o aminoácidos de origen no natural (para-acetil-Phe, para-azido-Phe) permite la orientación controlada y fijación de tales proteínas, polipéptidos y/o péptidos sobre una superficie de un soporte sólido o tener grupos tales como PEG, azúcares y/o conjugados PEG-colesterol fijados.

[00045] En otras realizaciones, tales modificaciones específicas a sitio se utilizan para
10 entrecruzar específicamente a sitio proteínas, polipéptidos y/o péptidos formando así hetero-oligómeros incluyendo pero sin limitar a heterodímeros y heterotrímeros. En otras realizaciones, tales modificaciones específicas a sitio se utilizan para entrecruzar específicamente a sitio proteínas, polipéptidos y/o péptidos formando conjugados proteína-proteína, conjugados proteína-polipéptido, conjugados proteína-péptido,
15 conjugados polipéptido-polipéptido, conjugados polipéptido-péptido o conjugados péptido-péptido. En otras realizaciones, una modificación específica a sitio puede incluir una punto de ramificación para permitir que más de un tipo de molécula sea fijada en un único sitio de una proteína, polipéptido o péptido.

[00046] En otras realizaciones, las modificaciones listadas en la presente pueden
20 realizarse en una forma no específica a sitio y resultar en conjugados proteína-proteína, conjugados proteína-polipéptido, conjugados proteína-péptido, conjugados polipéptido-polipéptido, conjugados polipéptido-péptido o conjugados péptido-péptido de la invención.

25 **Definiciones**

[00047] Varias definiciones se utilizan en este documento. La mayoría de las palabras tienen el significado que se atribuye a esas palabras por un experto en el estado de la técnica. Las palabras definidas específicamente a continuación o en otra parte de este documento tienen el significado proporcionado en el contexto del presente invento en su
30 conjunto y como normalmente se entiende por los expertos en el estado de la técnica.

[00048] Como se utiliza en la presente, el término "FGF21" se refiere a un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Una secuencia aminoácida de FGF21 (No. de Acceso GenBank NP_061986.1) se establece como SEQ ID NO: 1, la correspondiente secuencia polinucleótida la cual se establece como SEQ ID

NO: 2 (Número NCBI de referencia de secuencia NM_019113.2). “variante FGF21,” “mutante FGF21”, y términos similares describen la versión modificada de la proteína FGF21, por ejemplo, con residuos aminoácidos constituyentes suprimidos, agregados, modificados, o sustituidos.

5 **[00049]** Como se utiliza en la presente, el término “receptor FGF21 ” se refiere a un receptor para FGF21 (Kharitononkov,A. (2008) Journal of Cellular Physiology 215:1-7; Kurosu,Het al. (2007) JBC 282:26687-26695; Ogawa, Yet al. (2007) PNAS 104:7432-7437).

10 **[00050]** El término "Polipéptido FGF21" se refiere a un polipéptido de origen natural expresado en los seres humanos. Para fines de esta divulgación, el término "polipéptido FGF21" se puede utilizar indistintamente para referirse a cualquier polipéptido FGF21 de longitud completa, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, que consta de 209 residuos aminoácidos y que es codificado por la secuencia nucleótida SEQ ID NO: 2; cualquier forma madura del polipéptido, que consiste en 181 residuos aminoácidos, y en la que los 28 residuos
15 aminoácidos en el extremo amino-terminal del polipéptido FGF21 de longitud completa (es decir, que constituyen el péptido señal) han sido eliminados.

20 **[00051]** “Variante 76,” como se utiliza en la presente, es una variante de proteína de FGF21, que presenta un PEG ramificado de 40 kDa ligado a través de Cys154, y mutaciones de ocho puntos en relación con la proteína tipo silvestre de 177 aminoácidos. La síntesis de la variante se describe en detalle en la presente, y la secuencia de proteína se representa en la Tabla 1 y SEQ ID NO:9.

25 **[00052]** El término "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico del presente invento que (1) se ha separado de por lo menos un 50 por ciento de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, u otros materiales con los que se encuentra de forma natural cuando el ácido nucleico es aislado desde las células fuente,
30 (2) no está enlazada a la totalidad o parte de un polinucleótido al cual la "molécula de ácido nucleico aislada" está enlazada en la naturaleza, (3) está enlazada operativamente a un polinucleótido que no está enlazado en la naturaleza, o (4) no se da en la naturaleza como parte de una secuencia polinucleótida más grande. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención está sustancialmente libre de cualquier otra molécula de ácida nucleico contaminante u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que pudieran interferir con su uso en la producción de polipéptidos o su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación.

[00053] El término "vector" se utiliza para referirse a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) que se utiliza para transferir la información de codificación a una célula huésped.

5 **[00054]** El término "vector de expresión" se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula huésped y contiene secuencias de ácidos nucleicos que dirigen y/o controlan la expresión de secuencias heterólogas de ácidos nucleicos. La expresión incluye, pero no se limita a, los procesos como la transcripción, traducción y empalme de ARN, siempre y cuando haya intrones.

10 **[00055]** El término "enlazado operativamente" se utiliza aquí para referirse a un arreglo de las secuencias de flaqueo en donde las secuencias de flaqueo así descritas se configuran o montan para llevar a cabo su función habitual. Elementos de proteínas de fusión pueden enlazarse operativamente entre sí para permitir que la proteína de fusión funcione como si ésta fuera una proteína endógena natural, y/o para combinar elementos diferentes de dichas proteínas de fusión en una forma sinérgica.

15 **[00056]** En un nivel nucleotido, una secuencia de flaqueo operativamente enlazada a una secuencia de codificación puede ser capaz de realizar la replicación, transcripción y/o traducción de la secuencia codificadora. Por ejemplo, una secuencia codificadora está enlazada operativamente a un promotor cuando el promotor es capaz de dirigir la transcripción de la secuencia codificadora. Una secuencia de flaqueo no tiene por qué
20 ser contigua a la secuencia codificadora, siempre y cuando funcione correctamente. Por lo tanto, por ejemplo, secuencias sin traducir que intervienen pero que si fueron transcritas pueden estar presentes entre una secuencia promotora y la secuencia codificadora y la secuencia promotora puede seguir siendo considerada "operativamente enlazada" a la secuencia codificadora.

25 **[00057]** El término "célula huésped" se utiliza para referirse a una célula que se ha transformado, o es capaz de ser transformada con una secuencia de ácidos nucleicos y luego de expresar un gen de interés seleccionada. El término incluye la progenie de la célula precursora, bien sea que la progenie sea idéntica en la morfología o en la composición genética al precursor original, siempre y cuando el gen seleccionado esté
30 presente.

[00058] El término "aminoácido", como se utiliza en la presente, se refiere a aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales, todos en sus estereoisómeros D y L, si su estructura permite tales formas

estereoisoméricas. Los aminoácidos se denominan en adelante ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímicos IUPAC-IUB.

- [00059]** El término "natural" cuando se utiliza en relación con 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. Del mismo modo, "no natural" como se utiliza en la presente se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre. Cuando se utiliza en relación con los nucleótidos, el término "natural" se refiere a las bases adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U). Cuando se utiliza en relación con los aminoácidos, el término "natural" se refiere a los 20 amino ácidos convencionales (es decir, la 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)), así como selenocisteína, pirrolisina (PYL), y pirrolina-carboxi-lisina (Pcl, o Z).

- [00060]** La pirrolisina (Pyl) es un aminoácido que se encuentra naturalmente dentro de metilamina metiltransferasas de arqueobacterias (archaea) metanogénicas de la familia *Methanosarcina*. La pirrolisina es un análogo de lisina incorporado de manera co-traducciona en codones UAG dentro del mismo marco de lectura correspondiente, y se considera el aminoácido natural número 22.

- [00061]** Como se ha descrito al menos en la publicación de patente PCT WO2010/48582 (solicitante IRM, LLC), los intentos de biosintetizar la pirrolisina (PYL) en *E. coli* dieron lugar a la formación de una "pirrolisina desmetilada," en adelante, pirrolina-carboxi-lisina, o Pcl. "Pc", como se utiliza en la presente, se refiere tanto a PCL-A como a PCL-B.

- [00062]** Los términos "aminoácido no natural" y "aminoácido innatural" como se utilizan en la presente para representar las estructuras de aminoácidos que no se pueden generar biosintéticamente en cualquier organismo usando genes sin modificar o modificados a partir de cualquier organismo, ya sea el mismo o diferente. Los términos se refieren a un residuo de aminoácido que no está presente en la secuencia proteica de FGF21 de origen natural (tipo silvestre) o las secuencias de de la presente invento. Estos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos modificados y/o análogos de aminoácidos

que no son uno de los 20 aminoácidos naturales, selenocisteína, pirrolisina (PYL), o pirrolina-carboxi-lisina (PCL, por ejemplo, como se describe en la publicación de patente PCT WO2010/48582). Tales residuos aminoácidos no naturales pueden introducirse por la sustitución de aminoácidos de origen natural y/o mediante la inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia proteica FGF21 natural (tipo silvestre) o las secuencias de la invención. El residuo aminoácido no natural también puede incorporarse de tal manera que una funcionalidad deseada se imparte a la molécula de FGF21, por ejemplo, la capacidad para enlazar una fracción funcional (por ejemplo, PEG). Cuando se utiliza en conexión con aminoácidos, el símbolo "U" significa "aminoácido no natural" y aminoácido innatural," como se utiliza en la presente.

[00063] Además, se entiende que tales "aminoácidos no naturales" requieren un ARNt modificado y una sintetasa de ARNt modificada (RS) para su incorporación en una proteína. Estos pares ARNt/RS ortogonales "seleccionados" pares son generados por un proceso de selección desarrollado por Schultz o por mutación aleatoria o específica.

A manera de ejemplo, la pirrolina-carboxi-lisina es un "aminoácido natural" generado biosintéticamente por genes transferidos desde un organismo en las células huésped e incorporado en proteínas utilizando genes de sintetasa de ARNt natural y ARNt, mientras *p*-aminofenillalanina (Ver, **Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG.** J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9) es un "aminoácido no natural" puesto que, aunque se genera biosintéticamente, se incorpora en las proteínas por un par tRNA/tRNA sintetasa ortogonal "seleccionado".

[00064] Los aminoácidos codificados modificados incluyen, pero no se limitan a, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, O-fosfoserina, ácido azetidinacarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-amino-butírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico ácido 2-aminopimélico, butilglicina terciaria, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-metilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentilglicina, ácido pipercolico y tioprolina. El término "aminoácido" también incluye aminoácidos naturales que son metabolitos de ciertos organismos, pero no están

codificados por el código genético para su incorporación en las proteínas. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, ornitina, D-ornitina y D-arginina.

[00065] El término “análogo aminoácido,” como se utiliza en la presente, se refiere a compuestos que tienen la misma estructura básica que un aminoácido natural, a manera de ejemplo solamente, un carbono-□ que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R. Análogos aminoácidos incluyen los aminoácidos naturales y no naturales que son químicamente bloqueados, de manera reversible o irreversible, o su grupo carboxi C-terminal, su grupo amino N-terminal y/o sus grupos funcionales de cadena lateral son químicamente modificados. Tales análogos incluyen, pero no se limitan a, sulfóxido de metionina, metionina sulfona, S-(carboximetil)-cisteína, S-(carboximetil)-cisteína sulfóxido, S-(carboximetil)-cisteína sulfona, ácido aspártico-(beta-éster metílico), N-etilglicina, carboxamida de alanina, homoserina, norleucina, y metionina metil-sulfonio.

[00066] El término "miméticos de aminoácidos," como se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero funciona de manera similar que un aminoácido natural.

[00067] El término "variante biológicamente activa" se refiere a cualquier variante de polipéptido usado en las proteínas de fusión de la invención, por ejemplo, como una proteína constituyente de las fusiones, que posee una actividad de su proteína tipo silvestre (por ejemplo, de origen natural) o contraparte polipéptida, tal como la capacidad de modular niveles de glucosa en sangre, HbA1c, niveles de insulina, triglicéridos, o colesterol; aumentar la función pancreática; reducir los niveles de lípidos en el hígado; reducir el peso corporal, y mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto de energía, o sensibilidad a la insulina, independientemente del tipo o la cantidad de modificaciones que se han introducido en la variante polipeptídica. Los variantes polipeptídicos que poseen un nivel algo disminuido de la actividad relativa a sus versiones tipo silvestre no obstante, pueden considerarse como variantes polipeptídicos biológicamente activos. Un ejemplo no limitante representativo de un variante polipeptídico biológicamente activo de la invención es una variante de FGF21, que se modifica después, y posee propiedades biológicas similares o mejoradas con respecto a FGF21 de tipo silvestre.

[00068] Los términos "cantidad efectiva" y "cantidad terapéuticamente efectiva" se refieren cada uno a la cantidad de una proteína de fusión de la invención utilizada para apoyar un nivel observable de una o más actividades biológicas del polipéptido tipo

- silvestre o contrapartes de proteínas, tales como la capacidad para reducir los niveles de glucosa en sangre, insulina, triglicéridos o colesterol, reducir los triglicéridos en el hígado o los niveles de lípidos, reducir el peso corporal, o mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto energético, o la sensibilidad a la insulina. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se administra a un paciente que exhibe, padece, o está propenso a sufrir de trastornos asociados con FGF21 (tales como diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2, obesidad o síndrome metabólico), es una cantidad tal que induce, mejora o de lo contrario provoca una mejoría de los síntomas patológicos, progresión de la enfermedad, condiciones fisiológicas asociadas con los trastornos antes mencionados o resistencia a sucumbir a los mismos. Para efectos del presente invento, un "sujeto" o "paciente" es preferentemente un ser humano, pero también puede ser un animal, más específicamente, un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos, etc), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, y similares).
- 15 **[00069]** El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable" como se utiliza en la presente se refiere a uno o más materiales de formulación adecuados para lograr o mejorar la liberación de una proteína de fusión de la invención.
- 20 **[00070]** El término "antígeno" se refiere a una molécula o una porción de una molécula que es capaz de ser fijada por un anticuerpo, y, además, que es capaz de ser utilizada en un animal para producir anticuerpos que son capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.
- 25 **[00071]** El término "Fc nativo" se refiere a una molécula o secuencia que comprende la secuencia de un fragmento no fijador de antígenos resultante de la digestión del anticuerpo entero o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región de bisagra. La fuente original de la inmunoglobulina del Fc nativo es preferentemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque IgG1 e IgG2 son las preferidas. Las moléculas Fc nativas están formadas por polipéptidos monoméricos que pueden
- 30 conectarse a formas diméricas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces de disulfuro) y asociación no covalente. El número de enlaces de disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de moléculas Fc nativas oscila de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA e IgE) o la subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 y IgGA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por

puentes de disulfuro resultante de la digestión de papaína de una IgG (véase Ellison, 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). El término "Fc nativo" como se utiliza en la presente es genérico a las formas monomérica, dimérica, y multimérica.

[00072] El término "variante Fc" se refiere a una molécula o secuencia que es modificada desde un Fc nativo pero aún comprende un sitio de unión para el receptor de salvamento, FcRn (receptor Fc neonatal). Las Publicaciones Internacionales No. WO 97/34631 y WO 96/32478 describen variantes Fc de ejemplo, así como la interacción con el receptor de salvamento, y se incorporan en la presente como referencia. Por lo tanto, el término "variante Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que se pueden quitar, ya que proporcionan características estructurales o actividad biológica que no son necesarias para las moléculas de fusión de las proteínas de fusión de la invención. Por lo tanto, el término "variante Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios Fc nativos o residuos, o en los que uno o más sitios Fc o residuos se han modificado, que afectan o están implicados en: (1) formación de enlaces de disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal en la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación (5), interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor Fc diferente de un receptor de rescate, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los variantes Fc se describen más adelante con más detalle.

[00073] El término "dominio Fc" comprende variantes y secuencias Fc y Fc nativas como se definió anteriormente. Al igual que con los variantes Fc y moléculas Fc nativas, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya sea digeridas desde el anticuerpo completo o producidas por otros medios. En algunas realizaciones del presente invento, un dominio Fc puede fusionarse con FGF21 o un mutante de FGF21 (incluyendo una forma truncada de FGF21 o un mutante de FGF21) a través de, por ejemplo, un enlace covalente entre el dominio Fc y la secuencia de FGF21. Tales proteínas de fusión pueden formar multímeros a través de la asociación de los dominios Fc y estas proteínas de fusión y sus multímeros son un aspecto del presente invento.

[00074] El término "fragmento Fc modificado", como se utiliza en la presente, se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende una secuencia modificada. El fragmento Fc es una porción de un anticuerpo que comprende CH2, CH3 y parte de la región de bisagra. El fragmento Fc modificado puede derivarse a partir de, por ejemplo,

IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. FcLALA es un fragmento Fc modificado con una mutación LALA (L234A, L235A), que dispara ADCC con eficiencia reducida, y fija y activa el complemento humano de manera débil. Hessel et al. 2007 Nature 449:101-104.

Modificaciones adicionales al fragmento Fc se describen en, por ejemplo, la Patente
5 EE.UU. No. 7,217,798.

[00075] El término “heterólogo” significa que estos dominios no se encuentran de manera natural asociados con las regiones constantes de un anticuerpo. En particular, dichos dominios de unión heterólogos no tienen la estructura típica de un dominio variable de anticuerpo que consiste en 4 regiones marco, FR1, FR2, FR3 y FR4 y las 3
10 regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en el medio. Cada brazo del cuerpo fusionado por lo tanto comprende un primer polipéptido de cadena única que comprende un primer dominio de unión unido covalentemente en la parte N-terminal de una región constante de cadena pesada C_H1 de un anticuerpo, y un segundo polipéptido de cadena única que comprende un segundo dominio de unión unido covalentemente a la
15 parte N-terminal de una cadena constante ligera C_L de un anticuerpo. El enlace covalente puede ser directo, por ejemplo a través de un enlace peptídico o indirecto, a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador peptídico. Los dos heterodímeros del cuerpo fusionado se unen covalentemente, por ejemplo, por al menos un puente de disulfuro en su región de bisagra, como una estructura de anticuerpo. Ejemplos de
20 moléculas con una estructura de cuerpo fusionado se han descrito en la técnica, en particular, cuerpos fusionados que comprenden la región de unión a ligando del receptor heterodimérico (véase, por ejemplo las publicaciones de patente internacionales WO01/46261 y WO11/076781).

[00076] El término "polietilenglicol" o "PEG" se refiere a un compuesto de
25 polialquilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento o derivatización con fracciones acopladoras o activadoras.

[00077] El término "trastornos asociados con FGF21", y los términos utilizados de manera similar en la presente, incluyen pero no se limitan a la obesidad, diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad hepática grasa no
30 alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, infarto agudo del miocardio, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, enfermedad arterial periférica, accidente cerebro vascular, insuficiencia cardíaca,

enfermedad coronaria, enfermedad renal, complicaciones de la diabetes, neuropatía, gastroparesia y otros trastornos metabólicos.

[00078] El término "trastornos asociados con severas mutaciones inactivadoras en el receptor de la insulina", y términos similares utilizados en la presente, describen

5 condiciones en los sujetos afectados con mutaciones en el receptor de la insulina (o posibles proteínas directamente aguas abajo del mismo) que causan resistencia severa a la insulina, pero son a menudo (aunque no siempre) vistas sin la obesidad común en la diabetes mellitus tipo 2. En muchas formas, los sujetos que padecen estas enfermedades manifiestan síntomas híbridos de diabetes mellitus tipo 1 y diabetes mellitus tipo 2. Los

10 sujetos de este modo afligidos caen en varias categorías de severidad más o menos cada vez mayor, incluyendo: Resistencia a la insulina Tipo A, resistencia a la insulina Tipo C (síndrome AKA HAIR-AN), Síndrome Rabson-Mendenhall y, finalmente, el Síndrome de Donohue o Leprechaunismo. Estos trastornos están asociados con niveles muy altos de insulina endógena, y muy a menudo hiperglucemia,. Los sujetos así afectados

15 también presentan diversas características clínicas asociadas con la "toxicidad por insulina", incluyendo hiperandrogenismo, síndrome de ovario poliquístico (SOP), hirsutismo, y acantosis nigricans (crecimiento y pigmentación excesivos) en los pliegues de la piel.

[00079] "La diabetes mellitas tipo 2" es una condición caracterizada por la producción

20 de exceso de glucosa a pesar de la disponibilidad de insulina y los niveles de glucosa circulante siguen siendo excesivamente altos como consecuencia de la eliminación inadecuada de glucosa.

[00080] "La diabetes mellitus tipo 1" es una condición caracterizada por altos niveles de glucosa en la sangre causada por la falta total de insulina. Esto ocurre cuando el

25 sistema inmunológico del cuerpo ataca las células beta productoras de insulina en el páncreas y las destruye. Entonces, el páncreas produce poca o ninguna insulina.

[00081] La "intolerancia a la glucosa", o intolerancia a la glucosa deteriorada (IGT) es un estado pre-diabético de la disglucemia que se asocia con un mayor riesgo de patología cardiovascular. La condición pre-diabética impide que un sujeto mueva la glucosa en las

30 células de manera eficiente y la utilice como fuente de combustible eficiente, llevando a niveles elevados de glucosa en la sangre y algún grado de resistencia a la insulina.

[00082] "La hiperglucemia" se define como un exceso de azúcar (glucosa) en la sangre.

[00083] "Hipoglucemia", también conocida como azúcar baja en la sangre, se produce cuando el nivel de glucosa en sangre baja demasiado, para proporcionar la energía suficiente para las actividades del cuerpo.

5 [00084] "La hiperinsulinemia" se define como un nivel más alto de lo normal de la insulina en la sangre.

[00085] "Resistencia a la insulina" se define como un estado en el que una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica subnormal.

[00086] "La obesidad," en términos del sujeto humano, se puede definir como que el peso corporal de más de 20 por ciento por encima del peso ideal para una población dada
10 (R.H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, p. 904-916).

[00087] Las "complicaciones de la diabetes" son problemas causados por altos niveles de glucosa en la sangre, con otras funciones del cuerpo como los riñones, los nervios (neuropatía), pies (úlceras en los pies y la mala circulación) y los ojos (retinopatías, por ejemplo). La diabetes también aumenta el riesgo de enfermedad cardíaca y trastornos
15 óseos y articulares. Otras complicaciones a largo plazo de la diabetes incluyen problemas de la piel, problemas digestivos, disfunción sexual y problemas con los dientes y las encías.

[00088] "El síndrome metabólico" se puede definir como un grupo de al menos tres de los siguientes signos: la grasa abdominal - en la mayoría de los hombres, una cintura de
20 40 pulgadas o más; azúcar en la sangre - por lo menos 110 miligramos por decilitro (mg/dl) después de un ayuno; triglicéridos altos - por lo menos 150 mg/dL en la sangre, HDL bajo- menos de 40 mg/dl, y, presión arterial de 130/85 mmHg o superior.

[00089] "Pancreatitis" es la inflamación del páncreas.

[00090] "Dislipidemia" es un trastorno del metabolismo de las lipoproteínas, incluyendo la sobreproducción o deficiencia de lipoproteínas. Las dislipidemias se
25 pueden manifestar por la elevación de las concentraciones de colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de triglicéridos y una disminución en la concentración de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la sangre.

[00091] "Enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD)", es una enfermedad
30 hepática, no asociada con el consumo de alcohol, caracterizada por el cambio graso de los hepatocitos.

[00092] "La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)" es una enfermedad del hígado, no se asocia con el consumo de alcohol, se caracteriza por el cambio graso de los hepatocitos, acompañada por la inflamación y la fibrosis intralobular.

[00093] "La hipertensión" o presión arterial alta es una elevación transitoria o sostenida de la presión arterial sistémica a un nivel que pueda provocar daños cardiovasculares u otras consecuencias adversas. La hipertensión se ha definido arbitrariamente como una presión arterial sistólica por encima de 140 mmHg o una
5 presión arterial diastólica por encima de 90 mmHg.

[00094] "Las enfermedades cardiovasculares" son las enfermedades relacionadas con el corazón o los vasos sanguíneos.

[00095] "Infarto agudo del miocardio" ocurre cuando existe la interrupción del suministro de sangre a una parte del corazón. La isquemia resultante y la falta de
10 oxígeno, si se deja sin tratamiento durante un período de tiempo suficiente, pueden causar daño o muerte (infarto) del tejido muscular cardíaco (miocardio)

[00096] "La enfermedad arterial periférica" ocurre cuando se acumula placa en las arterias que llevan sangre a la cabeza, órganos y extremidades. Con el tiempo, la placa se endurece y estrecha las arterias, lo cual limita el flujo de sangre rica en oxígeno a los
15 órganos y otras partes del cuerpo.

[00097] "Aterosclerosis" es una enfermedad vascular caracterizada por depósitos de lípidos distribuidos irregularmente en la íntima de las arterias grandes y medianas, provocando un estrechamiento de las luces arteriales y procediendo eventualmente a la fibrosis y calcificación. Las lesiones suelen ser focales y progresar lentamente y de forma
20 intermitente. La limitación del flujo de sangre representa la mayoría de las manifestaciones clínicas que varían con la distribución y gravedad de las lesiones.

[00098] "Accidente cerebro vascular" es cualquier evento clínico agudo, relacionado con el deterioro de la circulación cerebral, que dura más de 24 horas. Un accidente cerebro vascular implica un daño cerebral irreversible, el tipo y la severidad de los
25 síntomas están en función de la localización y extensión del tejido cerebral cuya circulación se ha visto comprometida.

[00099] "La insuficiencia cardíaca", también denominada insuficiencia cardíaca congestiva, es una condición en la cual el corazón ya no puede bombear suficiente sangre al resto del cuerpo.

30 [000100] "La enfermedad coronaria", también llamada enfermedad de las arterias coronarias, es un estrechamiento de los pequeños vasos sanguíneos que suministran sangre y oxígeno al corazón.

[000101] "La enfermedad renal" o nefropatía es una enfermedad del riñón. La nefropatía diabética es una causa importante de morbilidad y mortalidad en personas con diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2.

5 [000102] "Neuropatías" son enfermedades que afectan a los nervios craneales o el sistema nervioso periférico o autónomo.

[000103] "Gastroparesia" es la debilidad de la peristalsis gástrica, que se traduce en retraso en el vaciado de los intestinos.

[000104] Los pacientes en estado crítico contemplados por el presente invento generalmente experimentan un estado hipermetabólico inestable. Este estado metabólico
10 inestable se debe a los cambios en el metabolismo del sustrato, que puede llevar a deficiencias relativas en algunos nutrientes. Por lo general hay un aumento de la oxidación de grasa y músculo.

[000105] Además, los pacientes críticamente enfermos son preferentemente pacientes que experimentan el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o dificultad
15 respiratoria. Una reducción de la morbilidad significa reducir la probabilidad de que un paciente críticamente enfermo desarrolle enfermedades, condiciones, o síntomas adicionales o la reducción de la severidad de enfermedades, condiciones, o síntomas adicionales. Por ejemplo la reducción de la morbilidad puede corresponder a una disminución en la incidencia de bacteremia o sepsis o complicaciones asociadas con la
20 falla de múltiples órganos.

[000106] Como se utilizan en la presente, las formas singulares "un", "una" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contenido claramente dicte lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una mezcla de dos o más anticuerpos.

25 [000107] Como se utiliza en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a +/- 20%, +/- 10%, o +/- 5% de un valor.

[000108] Los términos "polipéptido" y "proteína", se utilizan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados y sin codificar, aminoácidos naturales y no naturales,
30 aminoácidos química o bioquímicamente modificados o derivatizados, y polipéptidos con esqueletos peptídicos modificados. El término incluye las proteínas de fusión, incluyendo pero sin limitar a, las proteínas de fusión con una secuencia aminoácida heteróloga, fusiones con secuencias líderes heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina N-terminales; proteínas inmunológicamente etiquetadas; y similares.

- [000109]** Los términos "individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente" se usan indistintamente y se refieren a cualquier sujeto para el cual se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia, en particular los seres humanos. Otros sujetos pueden incluir ganado, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, y similares. En algunas realizaciones preferidas el sujeto es un ser humano.
- [000110]** Como se utilizan en la presente, el término "muestra" se refiere a material biológico de un paciente. La muestra ensayada por el presente invento no se limita a un determinado tipo. Las muestras incluyen como ejemplos no limitativos, células individuales, múltiples células, tejidos, tumores, fluidos biológicos, moléculas biológicas, o sobrenadantes o extractos de cualquiera de los anteriores. Los ejemplos incluyen tejido para biopsia, tejido extraído durante la resección, muestras de sangre, orina, tejido linfático, fluido linfático, fluido cefalorraquídeo, moco, y muestras coprológicas. La muestra utilizada puede variar en función del formato de ensayo, el método de detección y la naturaleza de los tumores, tejidos, células o extractos a ensayar.
- [000111]** Como se utiliza en la presente, el término "molécula biológica" incluye, pero no se limita a, polipéptidos, ácidos nucleicos, y sacáridos.
- [000112]** Como se utilizan en la presente, el término "modulación" se refiere a un cambio en la calidad o cantidad de un gen, proteína, o cualquier otra molécula que se encuentra dentro, fuera o sobre la superficie de una célula. El cambio puede ser un aumento o una disminución en la expresión o el nivel de la molécula. El término "modula" también incluye el cambio de calidad o cantidad de una función/actividad biológica, incluyendo, sin limitación, la capacidad para reducir los niveles de glucosa en sangre, insulina, triglicéridos o colesterol, reducir los niveles de lípidos del hígado o triglicéridos en el hígado, reducir el peso corporal y mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto energético, o sensibilidad a la insulina.
- [000113]** Tal como se utiliza en la presente, el término "modulador" se refiere a una composición que modula uno o más eventos fisiológicos y bioquímicos relacionados con un trastorno asociado de FGF21, tales como la diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2 o una afección metabólica como la obesidad. Dichos eventos incluyen, pero no se limitan a la capacidad de reducir los niveles de glucosa en sangre, insulina, triglicéridos o colesterol, reducir los niveles de lípidos del hígado o de triglicéridos en el hígado; reducir el peso

corporal, y mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto energético, o la sensibilidad a la insulina.

[000114] Un "producto génico" es un producto biopolimérico que se expresa o se produce por un gen. Un producto génico puede ser, por ejemplo, ARN sin cortar ni empalmar, un ARNm, un variante cortado y empalmado de ARNm, un polipéptido, un polipéptido modificado pos-traducción, un polipéptido variante de corte y empalme, etc. También incluidos por este término están los productos biopoliméricos que se elaboran utilizando un producto génico de ARN como un modelo (es decir, ADNc del RNA). Un producto génico puede ser hecho enzimáticamente, recombinantemente, químicamente, o dentro de una célula a la que el gen es nativo. En algunas realizaciones, si el producto génico es proteinaceo, éste presenta una actividad biológica. En algunas realizaciones, si el producto génico es un ácido nucleico, éste puede traducirse en un producto génico proteinaceo que presenta una actividad biológica.

[000115] "Modulación de la actividad de FGF21," como se utilizan en la presente, se refiere a un aumento o disminución de la actividad de FGF21 que puede ser el resultado de, por ejemplo, la interacción de un agente con un polinucleótido o polipéptido de FGF21, la inhibición de la transcripción y/o traducción de FGF21 (por ejemplo, a través de la interacción antisentido o ARNsi con el gen FGF21 o transcripto de FGF21, a través de la modulación de factores de transcripción que facilitan la expresión de FGF21), y similares. Por ejemplo, la modulación de la actividad biológica se refiere a un aumento o una disminución en la actividad biológica. La actividad de FGF21 puede ser evaluada por medio de, incluyendo, sin limitación, análisis de los niveles de glucosa en sangre, insulina, triglicéridos o colesterol en un sujeto, evaluar los niveles de polipéptidos de FGF21, o mediante la evaluación de los niveles de transcripción de FGF21. Las comparaciones de actividad de FGF21 también se pueden lograr, por ejemplo, midiendo los niveles de un biomarcador de FGF21 corriente abajo, y midiendo los aumentos en señalización de FGF21. La actividad de FGF21 también se puede evaluar midiendo: la señalización celular, la actividad de quinasa, la absorción de glucosa en adipocitos; midiendo fluctuaciones de los niveles de insulina en sangre, triglicéridos, o colesterol, cambios en los niveles de lípidos en el hígado o triglicéridos en el hígado, interacciones entre el FGF21 y un receptor de FGF21, o la fosforilación de un receptor de FGF21. En algunas realizaciones la fosforilación de un receptor de FGF21 puede ser la fosforilación de la tirosina. En algunas realizaciones, la modulación de la actividad de FGF21 puede causar la modulación de un fenotipo relacionado con FGF21.

[000116] Las comparaciones de actividad de FGF21 también se pueden lograr, por ejemplo, midiendo los niveles de un biomarcador de FGF21 corriente abajo, y midiendo los aumentos en señalización de FGF21. La actividad de FGF21 también se puede evaluar midiendo: la señalización celular, la actividad de quinasa, la absorción de glucosa en adipocitos; midiendo fluctuaciones de los niveles de insulina en sangre, triglicéridos, o colesterol, cambios en los niveles de lípidos en el hígado o triglicéridos en el hígado, interacciones entre el FGF21 y un receptor (FGFR-1c, FGFR-2c, or FGFR-3c), o la fosforilación de un receptor de FGF21. En algunas realizaciones la fosforilación de un receptor de FGF21 puede ser la fosforilación de la tirosina. En algunas realizaciones, la modulación de la actividad de FGF21 puede causar la modulación de un fenotipo relacionado con FGF21.

[000117] A "biomarcador de FGF21 corriente abajo", como se utiliza en la presente, es un gen o producto génico, o indicios medibles de un producto génico o gen. En algunas realizaciones, un gen o una actividad que es un marcador corriente abajo de FGF21 presenta un nivel alterado de expresión, o en un tejido vascular. En algunas realizaciones, una actividad del marcador corriente abajo se altera en presencia de un modulador de FGF21. En algunas realizaciones, los marcadores corriente abajo muestran niveles alterados de expresión cuando FGF21 es perturbado con un modulador de FGF21 del presente invento. Los marcadores corriente abajo de FGF21 incluyen, sin limitación, proteínas de absorción de glucosa o 2-desoxi-glucosa, pERK y otras proteínas fosforiladas o acetiladas o niveles NAD.

[000118] Tal como se utiliza en la presente, el término "regula de manera positiva" se refiere a un aumento, activación o estimulación de una actividad o cantidad. Por ejemplo, en el contexto del presente invento, los moduladores de FGF21 pueden aumentar la actividad de un receptor de FGF21. En una realización, uno o ambos FGFR-1c, FGFR-2c, or FGFR-3c pueden regularse de manera positiva en respuesta a un modulador de FGF21. La regulación positiva también puede referirse a una actividad relacionada con FGF21, como por ejemplo, la capacidad para reducir los niveles de la glucosa en sangre, insulina, triglicéridos o colesterol, reducir los niveles de lípidos o triglicéridos en el hígado, reducir el peso corporal, mejorar la tolerancia a la glucosa, el gasto energético, o la sensibilidad a la insulina, o producir la fosforilación de un receptor de FGF21, o incrementar un marcador corriente abajo de FGF21. El receptor FGFR21 puede ser uno o más entre FGFR-1c, FGFR-2c, o FGFR-3c. La regulación positiva puede ser al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, al menos 100%, al menos 150%,

al menos 200%, al menos 250%, al menos 400%, o al menos 500% en comparación con un control.

[000119] Como se utiliza en la presente, el término "extremo N " se refiere a por lo menos los primeros 20 aminoácidos de una proteína.

- 5 **[000120]** Como se utilizan en la presente, los términos "dominio N-terminal" y "región N-terminal" se usan indistintamente y se refieren a un fragmento de una proteína que se inicia en el primer aminoácido de la proteína y termina en cualquier aminoácido en la mitad N- terminal de la proteína. Por ejemplo, el dominio N-terminal de FGF21 es desde el aminoácido 1 de la SEQ ID NO: 1 a cualquier aminoácido entre los aminoácidos 10 y 105 de la SEQ ID NO: 1

[000121] Como se utiliza en la presente, el término "extremo C " se refiere a por lo menos los últimos 20 aminoácidos de una proteína.

- [000122]** Como se utilizan en la presente, los términos "dominio C-terminal" y "región C-terminal " se usan indistintamente y se refieren a un fragmento de una proteína que se
15 inicia en cualquier aminoácido en el medio C-terminal de la proteína y termina en el último aminoácido de la proteína. Por ejemplo, el dominio C-terminal de FGF21 se inicia en cualquier aminoácido desde el aminoácido 105 hasta aproximadamente el aminoácido 200 de la SEQ ID NO: 1 y termina en el aminoácido 209 de la SEQ ID NO: 1.

- 20 **[000123]** El término "dominio" como se utilizan en la presente se refiere a una parte estructural de una biomolécula que contribuye a una función conocida o sospechada de la biomolécula. Los dominios pueden ser co-extensivos con las regiones o partes del mismo y también pueden incorporar una parte de una biomolécula que es distinta de una región particular, además de toda o parte de esa región.

- 25 **[000124]** Como se utiliza en la presente, el término "dominio señal" (también llamado "secuencia señal" o "péptido señal") se refiere a un dominio peptídico que se encuentra en un tramo continuo de la secuencia aminoácida en la región N-terminal de una proteína precursora (a menudo unido por membrana o proteína secretada) y está involucrado en el transporte proteico pos-traducción. En muchos casos el dominio señal se elimina de la
30 proteína de longitud completa por peptidasas señal especializadas después de que el proceso de clasificación se ha completado. Cada dominio señal especifica un destino particular en la célula para la proteína precursora. El dominio señal de FGF21 es los aminoácidos 1-28 de la SEQ ID NO: 1.

[000125] Como se utiliza en la presente, el término "dominio fijador de receptores" se refiere a cualquier parte o región de una proteína que entra en contacto con una proteína receptora fijada a la membrana, lo que resulta en una respuesta celular, tal como un evento de señalización.

- 5 **[000126]** Como se utiliza en la presente, el término "dominio fijador de ligandos" se refiere a cualquier parte o región de una proteína de fusión de la invención que retiene al menos una actividad cualitativa de unión de una secuencia nativa correspondiente.

[000127] El término "región" se refiere a una porción físicamente contigua de la estructura primaria de una biomolécula. En el caso de las proteínas, la región se define
10 por una parte contigua de la secuencia aminoácida de esta proteína. En algunas realizaciones, una "región" se asocia con una función de la biomolécula.

[000128] El término "fragmento" como se utilizan en la presente se refiere a una porción físicamente contigua de la estructura primaria de una biomolécula. En el caso de las proteínas, una parte se define por una parte contigua de la secuencia aminoácida de
15 esa proteína y se refiere a por lo menos 3-5 aminoácidos, por lo menos 8-10 aminoácidos, por lo menos 11 a 15 aminoácidos, en por lo menos 17 a 24 aminoácidos, por lo menos 25 a 30 aminoácidos, y por lo menos 30 a 45 aminoácidos. En el caso de oligonucleótidos, una parte se define por una parte contigua de la secuencia de ácidos nucleicos de ese oligonucleótido y se refiere a por lo menos 9-15 nucleótidos, al menos
20 18 a 30 nucleótidos, al menos 33 a 45 nucleótidos, al menos 48 - 72 nucleótidos, al menos 75-90 nucleótidos, y al menos 90-130 nucleótidos. En algunas realizaciones, algunas partes de las biomoléculas tienen una actividad biológica. En el contexto del presente invento, fragmentos polipeptídicos de FGF21 no comprenden toda la secuencia polipeptídica de FGF21 divulgada en SEQ ID NO: 1.

- 25 **[000129]** Un polipéptido de "secuencia nativa" es aquel que tiene la misma secuencia aminoácida que un polipéptido derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o se pueden producir por vía recombinante o sintética. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia aminoácida de polipéptido humano natural, polipéptido murino, o polipéptido de
30 cualquier otra especie mamífera.

[000130] Como se utiliza en la presente, la frase "secuencia nucleótida homóloga," o "secuencia aminoácida homóloga", o variaciones de la misma, se refiere a las secuencias caracterizadas por una homología, a nivel nucleótido o a nivel aminoácido, de por lo menos un porcentaje determinado y se utiliza de manera intercambiable con "identidad

de secuencia". Secuencias nucleótidas homólogas incluyen aquellas secuencias que codifican las isoformas de las proteínas. Tales isoformas pueden expresarse en diferentes tejidos del mismo organismo como resultado de, por ejemplo, un corte y empalme alternativo del ARN. Por otra parte, las isoformas pueden ser codificadas por genes diferentes. Las secuencias nucleótidas homólogas incluyen secuencias nucleótidas que codifican una proteína de una especie diferente a los seres humanos, incluyendo pero sin limitar a, mamíferos. Secuencias nucleótidas homólogas también incluyen, pero no se limitan a, las variaciones alélicas de origen natural y las mutaciones de las secuencias nucleótidas divulgadas en el presente. Secuencias aminoácidas homólogas incluyen las secuencias aminoácidas que contienen sustituciones aminoácidas conservativas y cuyos polipéptidos tengan la misma unión y/o actividad. En algunas realizaciones, una secuencia nucleótida o aminoácido es homóloga si tiene al menos 60% o más, hasta 99%, de identidad con una secuencia comparadora. En algunas realizaciones, una secuencia nucleótida o aminoácido es homóloga si comparte uno o más, hasta 60 sustituciones, adicionales, o supresiones nucleótidas/aminoácidos con una secuencia de comparación. En algunas realizaciones, las secuencias aminoácidas homólogas no tienen más de cinco o no más de tres sustituciones aminoácidas conservadoras.

[000131] El porcentaje de homología o identidad puede determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (Paquete de Análisis de Secuencias de Wisconsin, versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, Universidad De investigación Parque, Madison WI), con la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 a 489). En algunas realizaciones, la homología entre la sonda y la diana está alrededor del 75% al 85%. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos tienen nucleótidos que son al menos 95%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% y aproximadamente 100% de homología con la SEC ID NO: 2, o una parte de la misma.

[000132] La homología también puede ser a nivel de polipeptídico. En algunas realizaciones, los polipéptidos constituyentes de las proteínas de fusión de la invención pueden ser al menos 95% homólogos con sus contrapartes tipo silvestre de longitud completa o secuencia nativas correspondientes, o porciones de las mismas. El grado o porcentaje de identidad de las Proteínas de Fusión de la invención, o porciones de las mismas, y secuencias aminoácidas diferentes se calcula como el número de equivalencias exactas en una alineación de dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de

la invención” o la “secuencia extraña”, la que sea más corta. El resultado se expresa como el porcentaje de identidad.

[000133] Como se utiliza en la presente, el término "mezclar" se refiere al proceso de combinar de uno o más compuestos, células, moléculas, y similares juntos en la misma zona. Esto se puede realizar, por ejemplo, en un tubo de ensayo, placa de Petri, o cualquier otro recipiente que permite a los compuestos, células o moléculas, mezclarse.

[000134] Como se utiliza en la presente, el término "sustancialmente purificado" se refiere a un compuesto (por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido o un anticuerpo) que se extrae de su entorno natural y es por lo menos 60% libre, por lo menos 75% libre, y por lo menos 90% libre de otros componentes con los que se asocia naturalmente.

[000135] El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tales como los anticuerpos o un polipéptido, genes y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que se puede administrar sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser grandes macromoléculas, metabolizadas lentamente tales como las proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros aminoácidos, agregados lípidos y partículas de virus inactivas. Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos en el estado de la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras del pH, y similares, también pueden estar presentes en dichos vehículos.

25 **Aumento de la Estabilidad Física de las Proteínas de Fusión de la Invención**

[000136] Los enlaces de disulfuro de origen natural, como se proporcionan mediante residuos de cisteína, generalmente aumentan la estabilidad termodinámica de las proteínas. Ejemplos exitosos de la estabilidad termodinámica aumentada, medida en aumento de la temperatura de fusión, son múltiples mutantes unidos por disulfuro de las enzimas lisozima T4 (Matsumura, PNAS 86:6562-6566 (1989)) y barnasa (Johnson ., J. Mol. Biol. 268:198-208 (1997)). Un aspecto del presente invento es una mejora de la estabilidad física de FGF21 en la presencia de un conservante, lograda por la presencia de enlaces de disulfuro dentro de los variantes, lo cual restringe la flexibilidad del FGF21 tipo silvestre y así limita el acceso del presertativo al núcleo hidrofóbico de la proteína.

- [000137]** El segundo aspecto del presente invento por lo tanto proporciona variantes del FGF21 humano, o un péptido biológicamente activo del mismo, con una mayor estabilidad farmacéutica generada por la incorporación de los enlaces de disulfuro adicionales, por ejemplo, a través de la incorporación o sustitución de los residuos de
- 5 cisteína en la proteína FGF21 tipo silvestre o los variantes polipeptídicos y proteicos del invento. Un experto en el estado de la técnica reconocerá que las cisteínas nativas, cisteína 103 y cisteína 121, podrían ser utilizadas como lugares para introducir un nuevo enlace de disulfuro que puede conferir propiedades mejoradas, además de las realizaciones sugeridas descriptas en la presente.
- 10 **[000138]** Estos incluyen proteínas de fusión que incorporan FGF-21 tipo silvestre con la sustitución de una cisteína por dos o más de los siguientes: glutamina 46, arginina 47, tirosina 48, leucina 49, tirosina 50, treonina 51, aspartato 52, aspartato 53, alanina 54, glutamina 55, glutamina 56, treonina 57, glutamato 58, alanina 59, histidina 60, leucina 61, glutamato 62, isoleucina 63, valina 69, glicina 70, glicina 71, alanina 72, alanina 73,
- 15 leucina 144, histidina 145, leucina 146, prolina 147, glicina 148, asparagina 149, lisina 150, serina 151, prolina 152, histidina 153, arginina 154, aspartato 155, prolina 156, alanina 157, prolina 158, arginina 159, glicina 160, prolina 161, alanina 162, arginina 163, fenilalanina 164, en donde la numeración de los aminoácidos se basa en la secuencia SEQ ID NO: 1 de hFGF21 de 209 aminoácidos de longitud completa.
- 20 **[000139]** Además, las proteínas de fusión de la invención pueden incorporar variantes del FGF21 humano tipo silvestre o un péptido biológicamente activo del mismo, los cuales son mejorados con con enlaces de disulfuro modificados, además de aquel natural en Cys103-Cys121, son los siguientes: Gln46Cys-Ala59Cys, Gln46Cys-His60Cys, Gln46Cys-Leu61Cys, Gln46Cys-Glu62Cys, Gln46Cys-Ile63Cys, Arg47Cys-Ala59Cys,
- 25 Arg47Cys-His60Cys, Arg47Cys-Leu61Cys, Arg47Cys-Glu62Cys, Arg47Cys-Ile63Cys, Tyr48Cys-Ala59Cys, Tyr48Cys-His60Cys, Tyr48Cys-Leu61Cys, Tyr48Cys-Glu62Cys, Tyr48Cys-Ile63Cys, Leu49Cys-Ala59Cys, Leu49Cys-His60Cys, Leu49Cys-Leu61Cys, Leu49Cys-Glu62Cys, Leu49Cys-Ile63Cys, Tyr50Cys-Ala59Cys, Tyr50Cys-His60Cys, Tyr50Cys-Lue61Cys, Tyr50Cys-Glu62Cys, Tyr50Cys-Ile63Cys, Leu144Cys-
- 30 Gly160Cys, Leu144Cys-Pro161Cys, Leu144Cys-Ala162Cys, Leu144Cys-Arg163Cys, Leu144Cys-Phe164Cys, His145Cys-Gly160Cys, His145Cys-Pro161Cys, His145Cys-Ala162Cys, His145Cys-Arg163Cys, His145Cys-Phe164Cys, Leu146Cys-Gly160Cys, Leu146Cys-Pro161Cys, Leu146Cys-Ala162Cys, Leu146Cys-Arg163Cys, Leu146Cys-Phe164Cys, Pro147Cys-Gly160Cys, Pro147Cys-Pro161Cys, Pro147Cys-Ala162Cys,

Pro147Cys-Arg163Cys, Pro147Cys-Phe164Cys, Gly148Cys-Gly160Cys, Gly148Cys-Pro161Cys, Gly148Cys-Ala162Cys, Gly148Cys-Arg163Cys, Gly148Cys-Phe164Cys, Thr57Cys-Val69Cys, Thr57Cys-Gly70Cys, Thr57Cys-Gly71Cys, Thr57Cys-Ala72Cys, Thr57Cys-Ala73Cys, Glu58Cys-Val69Cys, Glu58Cys-Glu70Cys, Glu58Cys-G71Cys, 5 Glu58Cys-Ala72Cys, Glu58Cys-Ala73Cys, Ala59Cys-Val69Cys, Ala59Cys-Gly70Cys, Ala59Cys-Gly71Cys, Ala59Cys-Ala72Cys, Ala59Cys-Ala73Cys, His60Cys-Val69Cys, His60Cys-Gly70Cys, His60Cys-Gly71Cys, His60Cys-Ala72Cys, His60Cys-Ala73Cys, Leu61Cys-Val69Cys, Leu61Cys-Gly70Cys, Leu61Cys-Gly71Cys, Leu61Cys-Ala72Cys, Leu61Cys-Ala73Cys, Arg47Cys-Gly148Cys, Tyr48Cys-Gly148Cys, Leu49Cys- 10 Gly148Cys, Tyr50Cys-Gly148Cys, Thr51Cys-Gly148Cys, Asp52Cys-Gly148Cys, Asp53Cys-Gly148Cys, Ala54Cys-Gly148Cys, Gln55Cys-Gly148Cys, Gln56Cys-Gly148Cys, Thr57Cys-Gly148Cys, Glu58Cys-Gly148Cys, Arg47Cys-Asn149Cys, Tyr48Cys-Asn149Cys, Leu49Cys-Asn149Cys, Tyr50Cys-Asn149Cys, Thr51Cys-Asn149Cys, Asp52Cys-Asn149Cys, Asp53Cys-Asn149Cys, Ala54Cys-Asn149Cys, 15 Gln55Cys-Asn149Cys, Gln56Cys-Asn149Cys, Thr57Cys-Asn149Cys, Glu58Cys-Asn149Cys, Arg47Cys-Lys150Cys, Tyr48Cys-Lys150Cys, Leu49Cys-Lys150Cys, Tyr50Cys-Lys150Cys, Thr51Cys-Lys150Cys, Asp52Cys-Lys150Cys, Asp53Cys-Lys150Cys, Ala54Cys-Lys150Cys, Gln55Cys-Lys150Cys, Gln56Cys-Lys150Cys, Thr57Cys-Lys150Cys, Glu58Cys-Lys150Cys, Arg47Cys-Ser151Cys, Tyr48Cys- 20 Ser151Cys, Leu49Cys-Ser151Cys, Tyr50Cys-Ser151Cys, Thr51Cys-Ser151Cys, Asp52Cys-Ser151Cys, Asp53Cys-Ser151Cys, Ala54Cys-Ser151Cys, Gln55Cys-Ser151Cys, Gln56Cys-Ser151Cys, Thr57Cys-Ser151Cys, Glu58Cys-Ser151Cys, Arg47Cys-Pro152Cys, Tyr48Cys-Pro152Cys, Leu49Cys-Pro152Cys, Tyr50Cys-Pro152Cys, Thr51Cys-Pro152Cys, Asp52Cys-Pro152Cys, Asp53Cys-Pro152Cys, 25 Ala54Cys-Pro152Cys, Gln55Cys-Pro152Cys, Gln56Cys-Pro152Cys, Thr57Cys-Pro152Cys, Glu58Cys-Pro152Cys, Arg47Cys-His153Cys, Tyr48Cys-His153Cys, Leu49Cys-His153Cys, Tyr50Cys-His153Cys, Thr51Cys-His153Cys, Asp52Cys-His153Cys, Asp53Cys-His153Cys, Ala54Cys-His153Cys, Gln55Cys-His153Cys, Gln56Cys-His153Cys, Thr57Cys-His153Cys, Glu58Cys-His153Cys, Arg47Cys- 30 Arg154Cys, Tyr48Cys-Arg154Cys, Leu49Cys-Arg154Cys, Tyr50Cys-Arg154Cys, Thr51Cys-Arg154Cys, Asp52Cys-Arg154Cys, Asp53Cys-Arg154Cys, Ala54Cys-Arg154Cys, Gln55Cys-Arg154Cys, Gln56Cys-Arg154Cys, Thr57Cys-Arg154Cys, Glu58Cys-Arg154Cys, Arg47Cys-Asp155Cys, Tyr48Cys-Asp155Cys, Leu49Cys-Asp155Cys, Tyr50Cys-Asp155Cys, Thr51Cys-Asp155Cys, Asp52Cys-Asp155Cys,

Asp53Cys-Asp155Cys, Ala54Cys-Asp155Cys, Gln55Cys-Asp155Cys, Gln56Cys-
 Asp155Cys, Thr57Cys-Asp155Cys, Glu58Cys-Asp155Cys, Arg47Cys-Pro156Cys,
 Tyr48Cys-Pro156Cys, Leu49Cys-Pro156Cys, Tyr50Cys-Pro156Cys, Thr51Cys-
 Pro156Cys, Asp52Cys-Pro156Cys, Asp53Cys-Pro156Cys, Ala54Cys-Pro156Cys,
 5 Gln55Cys-Pro156Cys, Gln56Cys-Pro156Cys, Thr57Cys-Pro156Cys, Glu58Cys-
 Pro156Cys, Arg47Cys-Ala157Cys, Tyr48Cys-Ala157Cys, Leu49Cys-Ala157Cys,
 Tyr50Cys-Ala157Cys, Thr51Cys-Ala157Cys, Asp52Cys-Ala157Cys, Asp53Cys-
 Ala157Cys, Ala54Cys-Ala157Cys, Gln55Cys-Ala157Cys, Gln56Cys-Ala157Cys,
 Thr57Cys-Ala157Cys, Glu58Cys-Ala157Cys, Arg47Cys-Pro158Cys, Tyr48Cys-
 10 Pro158Cys, Leu49Cys-Pro158Cys, Tyr50Cys-Pro158Cys, Thr51Cys-Pro158Cys,
 Asp52Cys-Pro158Cys, Asp53Cys-Pro158Cys, Ala54Cys-Pro158Cys, Gln55Cys-
 Pro158Cys, Gln56Cys-Pro158Cys, Thr57Cys-Pro158Cys, Glu58Cys-Pro158Cys,
 Arg47Cys-Arg159Cys, Tyr48Cys-Arg159Cys, Leu49Cys-Arg159Cys, Tyr50Cys-
 Arg159Cys, Thr51Cys-Arg159Cys, Asp52Cys-Arg159Cys, Asp53Cys-Arg159Cys,
 15 Ala54Cys-Arg159Cys, Gln55Cys-Arg159Cys, Gln56Cys-Arg159Cys, Thr57Cys-
 Arg159Cys, Glu58Cys-Arg159Cys, Arg47Cys-G160Cys, Tyr48Cys-G160Cys,
 Leu49Cys-G160Cys, Tyr50Cys-Gly160Cys, Thr51Cys-Gly160Cys, Asp52Cys-
 Gly160Cys, Asp53Cys-Gly160Cys, Ala54Cys-Gly160Cys, Gln55Cys-Gly160Cys,
 Gln56Cys-Gly160Cys, Thr57Cys-Gly160Cys, Glu58Cys-Gly160Cys, Arg47Cys-
 20 Pro161Cys, Tyr48Cys-Pro161Cys, Leu49Cys-Pro161Cys, Tyr50Cys-Pro161Cys,
 Thr51Cys-Pro161Cys, Asp52Cys-Pro161Cys, Asp53Cys-Pro161Cys, Ala54Cys-
 Pro161Cys, Gln55Cys-Pro161Cys, Gln56Cys-Pro161Cys, Thr57Cys-Pro161Cys,
 Glu58Cys-Pro161Cys, Arg47Cys-Ala162Cys, Tyr48Cys-Ala162Cys, Leu49Cys-
 Ala162Cys, Tyr50Cys-Ala162Cys, Thr51Cys-Ala162Cys, Asp52Cys-Ala162Cys,
 25 Asp53Cys-Ala162Cys, Ala54Cys-Ala162Cys, Gln55Cys-Ala162Cys, Gln56Cys-
 Ala162Cys, Thr57Cys-Ala162Cys, Glu58Cys-Ala162Cys, Arg47Cys-Arg163Cys,
 Tyr48Cys-Arg163Cys, Leu49Cys-Arg163Cys, Tyr50Cys-Arg163Cys, Thr51Cys-
 Arg163Cys, Asp52Cys-Arg163Cys, Asp53Cys-Arg163Cys, Ala54Cys-Arg163Cys,
 Gln55Cys-Arg163Cys, Gln56Cys-Arg163Cys, Thr57Cys-Arg163Cys, Glu58Cys-
 30 Arg163Cys

[000140] Otro aspecto de la presente invención proporciona proteínas de fusión que
 comprenden variantes del FGF21 humano tipo silvestre, o un péptido biológicamente
 activo del mismo, que comprende una sustitución de cualquier aminoácido cargado y/o
 polar pero no cargado sobre cualquiera de las posiciones aminoácidas indicadas en la

primera realización de la presente invención combinada con la sustitución de una cisteína en dos o más posiciones aminoácidas indicadas en la segunda realización de la invención.

5 **Mejoras de las Proteínas de Fusión de la Invención Sobre Comparadores de Proteínas Tipo Silvestre y Variantes de los Mismos**

- [000141] Es bien sabido en el estado de la técnica que un reto importante en el desarrollo de productos farmacéuticos de proteínas es hacer frente a las inestabilidades físicas y químicas de las proteínas. Esto es aún más evidente cuando una formulación farmacéutica proteica está destinada a ser una formulación inyectable multi-uso, que requiere una solución estable, concentrada y conservada, mientras mantiene un perfil de bioactividad favorable. La caracterización biofísica detallada de FGF21 tipo silvestre establece que una solución proteica concentrada (> 5 mg/ml), cuando se expone a condiciones de estrés, tales como altas temperaturas o bajo pH, lleva a asociación y agregación aceleradas (es decir, poca estabilidad física y propiedades biofarmacéuticas). La exposición de una solución proteica concentrada de FGF21 a los preservativos farmacéuticos (por ejemplo, m-cresol) también tuvo un impacto negativo sobre la estabilidad física.
- [000142] Por lo tanto, una realización del presente invento pretende mejorar la estabilidad física de las soluciones concentradas, manteniendo la estabilidad química y la potencia biológica, tanto en condiciones fisiológicas y preservadas de la formulación. Se cree que la asociación y agregación pueden resultar de las interacciones hidrofóbicas, ya que, a una concentración proteica determinada, la temperatura y fuerza iónica tienen un impacto considerable sobre la estabilidad física. Principalmente, se atacaron residuos aminoácidos no conservados, que se presumían expuestos en superficie. El ambiente local de los residuos se analizó y, aquellos los que no fueron considerados estructuralmente importantes fueron seleccionados para la mutagénesis. Un método para iniciar los cambios específicos es disminuir aún más el pI de la proteína mediante la introducción de residuos de ácido glutámico ("barrido con ácido glutámico"). Se hipotetizó que la introducción de sustitutos cargados podría inhibir la agregación hidrofóbica mediada a través de una repulsión de carga contra carga y, potencialmente, mejorar la compatibilidad preservativa. Además, el experto en el estado de la técnica también reconocería que con suficiente grado de mutagénesis el pI podría ser cambiado en un rango de pH básico mediante la introducción de carga positiva con o sin

disminución concomitante en carga negativa, lo que permite la repulsión de carga contra carga.

[000143] Una dificultad adicional asociada con las aplicaciones terapéuticas de FGF21 tipo silvestre como un bioterapéutico, por ejemplo, es que su vida media es muy corta in vivo (en el orden de 0,5 y 2 h, respectivamente, en ratón y primate). Existe por lo tanto una necesidad de desarrollar compuestos de seguimiento que sean más eficaces ya sea a través de una potencia más alta o vida media mayor. Las proteínas de fusión de la invención se desarrollaron como una manera de conseguir los efectos deseables de tratamiento con FGF21 a una potencia más alta y en una formulación vida media extendida.

[000144] Como se describe adicionalmente en la presente, las proteínas de fusión de la invención tienen vidas medias de más de dos semanas en el ratón, en comparación con la vida media mucho más corta de FGF21 tipo silvestre y la vida media de 17 horas de la proteína de fusión Fc-L (15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) en la publicación PCT WO10/129600. Las proteínas de fusión de la invención también demuestran propiedades mejoradas de vida media y farmacocinéticas en comparación con V76 PEGilada, como se describe en la presente y en la solicitud de patente EE.UU. 61/415.476, presentada el 19 de noviembre de 2010.

[000145] Además, las proteínas de fusión Fc-FGF21 de la invención a 1 mpk son más eficaces que V76 a 5 mpk en la reducción de la glucosa, insulina, peso corporal y lípidos del hígado. En un estudio de tratamiento de 12-días en ratones ob/ob, las proteínas de fusión muestran los cambios siguientes % de vehículo (todas las fusiones se administran a 1.0 mg/kg, y V76 se administra a 5.0 mg/kg):

[000146] El cambio porcentual total de glucosa (AUC) desde vehículo: V76 es -46%, V101 es -53%, V103 es -69% y V188 es -42%;

[000147] El cambio porcentual total de insulina plasmática desde el vehículo: V76 es -46%, V101 es -82%, V103 es -69% y V188 es -59%;

[000148] El cambio porcentual total de peso corporal desde el vehículo: V76 es un -7%; V101 es de -12%, V103 es -12%, y V188 es -11%, y

[000149] El cambio porcentual total de lípidos en el hígado desde el vehículo: V76 es -30%, V101 es -44%, V103 es -50% y V188 es -51%.

[000150] De manera similar, ensayos in vitro revelan la misma potencia de 5 veces o más de las proteínas de fusión de la invención sobre V76:

[000151] En el ensayo pERK en adipocitos humanos (EC_{50} media $\pm$ SEM), V76 es 21 ± 2 nM ($n = 3$); V101 es 1.0 ± 0.1 nM ($n = 3$), V103 es 1.3 ± 0.2 nM ($n = 3$), y V188 es 1.4 ± 0.4 nM ($n = 3$);

[000152] En el ensayo pERK en HEK293 con β klotho humano (EC_{50} media $\pm$ SEM),
5 V76 es 13 ± 4 nM ($n = 5$), V101 es 0.60 ± 0.06 nM ($n = 5$), V103 es 0.9 ± 0.3 nM ($n = 5$), y V188 es 0.4 ± 0.1 nM ($n = 3$); y

[000153] En el ensayo de captación de glucosa en adipocitos de ratón (EC_{50} media $\pm$ SEM), V76 es 5 ± 1 nM ($n = 3$), V101 es 0.60 ± 0.06 nM ($n = 3$), V103 es 0.60 ± 0.07 nM ($n = 3$), y V188 es 0.48 ± 0.14 nM ($n = 3$).

10 **[000154]** Aunque las realizaciones de la presente invención se preocupan por la estabilidad física y química, tanto en condiciones fisiológicas como preservadas de la formulación farmacéutica, el mantenimiento de la potencia biológica de las proteínas de fusión de la invención en comparación con el FGF21 tipo silvestre también es un factor importante de consideración también. Por lo tanto, la potencia biológica de las proteínas
15 de la presente invención se define por la capacidad de las proteínas para afectar la absorción de glucosa y/o reducir los niveles de glucosa plasmática, como se muestra en la presente en los ejemplos.

[000155] Las proteínas, polipéptidos, y/o péptidos de la invención administrados de acuerdo con esta invención pueden ser generados y/o aislados mediante cualquiera de los
20 medios conocidos en el estado de la técnica. El método más preferido para la producción del variante es a través de metodologías de ADN recombinantes y es bien conocido por los expertos en el estado de la técnica. Estos métodos se describen en Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.), que se incorpora en la presente como referencia.

25 **[000156]** Además, las realizaciones preferidas incluyen un péptido biológicamente activo derivado del variante descrito en este documento. Dicho péptido contiene al menos una de las sustituciones descritas y el variante posee actividad biológica. El péptido puede ser producido por cualquiera y todos los medios conocidos por los expertos en el estado de la técnica, ejemplos incluyen pero no se limitan a la digestión
30 enzimática, la síntesis química o metodologías de ADN recombinante.

[000157] Se establece en el estado de la técnica que los fragmentos de péptidos de ciertos factores de crecimiento de fibroblastos son biológicamente activos. Véase, por ejemplo, Baird, Proc. Natl. Acad. Ciencia (EE.UU.) 85:2324-2328 (1988), y J. Cell. Phys. Supl. 5:101-106 (1987). Por lo tanto, la selección de fragmentos o péptidos del

variante se basa en criterios conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, se sabe que la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) es una proteasa de tipo serina involucrada en la inactivación de neuropéptidos, péptidos endocrinos, y citoquinas (Damme Chem.

Immunol 72: 42-56, (1999)). El extremo N de FGF21 (HisProIlePro) contiene dos

- 5 dipéptidos que podrían ser sustratos potencialmente a la DPP-IV, lo que resulta en un fragmento de FGF21 truncado en el extremo N por 4 aminoácidos. Inesperadamente, se ha demostrado que este fragmento de FGF21 tipo silvestre mantiene la actividad biológica, por lo tanto, las proteínas de la presente invención truncadas en el extremo N por un máximo de 4 aminoácidos, es una realización de la presente invención.

- 10 **[000158]** El invento también contempla polinucleótidos que codifican los variantes descritos anteriormente que pueden estar en forma de ARN o en la forma de ADN, tal ADN incluye ADNc, ADN genómico, y ADN sintético. El ADN puede ser de doble hebra o de hebra sencilla. Las secuencias codificadoras que codifican las proteínas de la presente invención pueden variar como consecuencia de la redundancia o degeneración
15 del código genético.

- [000159]** Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la invención pueden incluir lo siguiente: sólo la secuencia codificadora para el variante, la secuencia codificadora para el variante y la secuencia codificadora adicional tal como un polipéptido funcional, o una secuencia líder o secretora o una secuencia pro-proteica, la
20 secuencia codificadora del variante y la secuencia no codificadora, tales como intrones o la secuencia no codificadora 5' y/o 3' de la secuencia codificadora para el variante. Así, el término "polinucleótido que codifica un variante" abarca un polinucleótido que puede incluir no sólo la secuencia codificadora del variante, sino también un polinucleótido, que incluye la secuencia adicional codificadora y/o no codificadora.

- 25 **[000160]** El invento se refiere además a los variantes de los polinucleótidos descritos que codifican los fragmentos, análogos y derivados del polipéptido que contienen las sustituciones indicadas. El variante del polinucleótido puede ser un variante alélico de origen natural de la secuencia FGF21 humana, un variante de origen no natural, o un variante truncado como se describió anteriormente. Por lo tanto, el presente invento
30 también incluye polinucleótidos que codifican los variantes descritas anteriormente, así como los variantes de tales polinucleótidos, que codifican un fragmento, derivado o análogo del variante divulgado. Tales variantes nucleótidos incluyen variantes de supresión, variantes de sustitución, variantes truncados, y variantes de adición o

inserción, siempre que al menos una de las sustituciones aminoácidas indicas de la primera o segunda realizaciones esté presente.

- [000161]** Los polinucleótidos de la invención se expresarán en huéspedes después que las secuencias se han enlazado de manera operativa a (es decir, posicionado para
- 5 garantizar el funcionamiento de) una secuencia de control de la expresión. Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos hospederos ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Por lo general, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina y la dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de las células
- 10 transformadas con las secuencias de ADN deseadas. El variante del FGF21 se puede expresar en células de mamíferos, insectos, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. Los sistemas de traducción libres de células también pueden ser empleados para producir tales proteínas, usando ARNs derivados de constructos de ADN del presente invento.
- 15 **[000162]** *E. coli* es un huésped procariótico particularmente útil para la clonación de los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para utilizar incluyen *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y varias especies de *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, aunque otros también pueden ser empleados como una cuestión de elección. En estos huéspedes procarióticos,
- 20 también se pueden hacer vectores de expresión, que normalmente contendrán las secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, cualquiera de una serie de promotores bien conocidos pueden estar presentes, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de la beta-lactamasa, o un sistema promotor a
- 25 partir de fagos lambda o T7. Los promotores normalmente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión de ribosomales y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.
- [000163]** Un experto en el estado de la técnica de la expresión de proteínas reconocerá que la secuencia de metionina o metionina-arginina puede ser introducida en el extremo
- 30 N de la secuencia madura (SEQ ID NO: 3) para la expresión en *E. coli* y se contemplan dentro del contexto de esta invención. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, las proteínas de la presente invención expresados en *E. coli* tienen una secuencia de metionina introducida en el extremo N.

- [000164] Otros microbios, como las levaduras o los hongos, también pueden ser utilizados para la expresión. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia angusta* son ejemplos de los huéspedes de levadura preferidos, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares como se desee. *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* y *Schizophyllum commune*, son ejemplos de los huéspedes de hongos, aunque otros también pueden ser empleados como una cuestión de elección.
- 5
- 10 [000165] El cultivo de células de tejido mamífero también puede utilizarse para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención. Las células eucarióticas son en realidad preferidas, debido a que un número de líneas celulares hospederas adecuadas capaces de secretar variantes intactos se han desarrollado en el estado de la técnica, e incluyen las líneas de células CHO, varias líneas de células COS, células NSO,
- 15 líneas celulares de ovario de hámster sirio, células HeLa, o líneas celulares de riñón embrionario humano (es decir, HEK293, HEK293EBNA).
- [000166] Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador, y sitios de procesamiento de información necesarios, tales como sitios de
- 20 unión del ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación, secuencias terminales de transcripción. Las secuencias de control de expresión son promotores derivados de SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus, virus del sarcoma de Raus, y similares. Los sitios preferidos de poliadenilación incluyen secuencias derivadas de la hormona de crecimiento bovino y SV40.
- 25 [000167] Los vectores que contienen las secuencias polinucleótidas de interés (por ejemplo, las proteínas de fusión de la invención y las secuencias de control de expresión) pueden transferirse a la célula huésped mediante métodos bien conocidos, los cuales varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariotas, mientras que el
- 30 tratamiento con fosfato de calcio o electroporación puede utilizarse para otros huéspedes celulares.
- [000168] Varios métodos de purificación de proteínas pueden emplearse y tales métodos son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990) y Scopes, *Protein Purification*:

Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982). Los pasos de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza de los procesos de producción utilizados para las proteínas de fusión de la invención.

[000169] Las proteínas, polipéptidos y/o péptidos de la invención, por ejemplo, las proteínas de fusión de actividad dual de la invención, deben formularse y dosificarse de una forma consistente con la buena práctica médica, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente, el sitio de suministro de las composiciones de proteína, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente efectiva" de las proteínas de fusión de la invención para propósitos en la presente está por lo tanto determinada por tales consideraciones.

[000170] Las composiciones farmacéuticas de las proteínas de la presente invención se pueden administrar por cualquier medio que alcance el objetivo general previsto: para tratar diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, obesidad, síndrome metabólico, o pacientes en estado crítico. Medios permisibles no limitativos de administración incluyen, por ejemplo, por inhalación o supositorio o al tejido mucosal tal como por lavado a tejido vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual, de manera oral, nasal, tópica, intranasal, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intramuscular, intraesternal, mediante inyección intraarticular, de manera intralinfática, intersticial, intraarterial, subcutánea, intrasinovial, transepitelial y transdérmica. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran mediante lavado, por vía oral o inter-arterial. Otros métodos adecuados de introducción también pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables o dispositivos poliméricos de liberación lenta o sostenida. Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse como parte de una terapia combinatoria con otros agentes metabólicos conocidos.

[000171] La dosificación administrada dependerá de la edad, la salud y peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, en su caso, la frecuencia del tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado. Composiciones en el ámbito del invento incluyen todas las composiciones en las que un variante del FGF21 está presente en una cantidad que es eficaz para lograr el efecto médico deseado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2, obesidad o síndrome metabólico. Si bien las necesidades individuales pueden variar de un paciente a otro, la determinación de los rangos óptimos de cantidades efectivas de todos los componentes se encuentra dentro de la capacidad del médico experto.

- [000172] Las proteínas de la presente invención pueden formularse de acuerdo con los métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Una formulación deseada sería una que es un producto estable liofilizado que se reconstituye con un diluyente apropiado o una solución acuosa de alta pureza con vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales, conservantes, excipientes o estabilizadores [Remington Pharmaceutical Sciences, 16^a edición (1980)]. Las proteínas de la presente invención se pueden combinar con un buffer farmacéuticamente aceptable, y el pH se puede ajustar para proporcionar estabilidad aceptable, y un pH aceptable para administración.
- 5
- [000173] Para administración parenteral, en una realización, las proteínas de fusión de la invención se formulan generalmente mediante la mezcla de una o más de ellas en el grado de pureza deseado, en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que no es tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y es compatible
- 15
- con otros ingredientes de la formulación. Preferentemente, uno o más agentes anti-microbianos farmacéuticamente aceptables se pueden añadir. Fenol, m-cresol y alcohol bencílico son los agentes anti-microbianos farmacéuticamente aceptables preferidos.
- [000174] Opcionalmente, una o más sales farmacéuticamente aceptables se pueden añadir para ajustar la fuerza iónica o la tonicidad. Uno o más excipientes se pueden
- 20
- añadir para ajustar aún más la isotonicidad de la formulación. Glicerina, cloruro de sodio y manitol, son ejemplos de un excipiente de ajuste de isotonicidad.
- [000175] Los expertos en el estado de la técnica fácilmente pueden optimizar las dosificaciones farmacéuticamente eficaces y pautas de administración de composiciones terapéuticas que comprenden las Proteínas de la invención, según lo determinado por la
- 25
- buena práctica médica y la condición clínica de cada paciente. Un intervalo de dosis típico para las proteínas de la presente invención variará de aproximadamente 0,01 mg por día a 1000 mg por día (o alrededor de 0,05 mg por semana a unos 5000 mg por semana administrada una vez a la semana) para un adulto. Preferiblemente, la dosis varía de 0,1 mg por día a 100 mg por día (o 0,5 mg por semana a 500 mg por semana
- 30
- administrada una vez por semana), más preferiblemente de aproximadamente 1,0 mg/día a 10 mg/día (o alrededor de 5 mg por semana a 50 mg por semana administrados una vez por semana). Más preferiblemente, la dosis es de 1-5 mg/día (aproximadamente 5 mg por semana a 25 mg por semana administrados una vez por semana). La dosis adecuada de un variante del FGF21 administrado se traducirá en reducción de los niveles de glucosa

en sangre y el aumento del gasto energético por la utilización de glucosa más rápido y eficiente, y por lo tanto es útil para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, obesidad y síndrome metabólico.

- [000176] Además, debido a que la hiperglucemia y la resistencia a la insulina son
5 comunes en pacientes críticamente enfermos dado el soporte nutricional, algunas UCIs administran insulina para el tratamiento de la hiperglucemia excesiva en pacientes alimentados y en estado crítico. De hecho, estudios recientes documentan que el uso de insulina exógena para mantener la glucosa sanguínea en un nivel no superior a 110 mg por decilitro, redujo la morbilidad y mortalidad entre los pacientes críticamente enfermos
10 en la unidad de cuidados intensivos quirúrgicos, independientemente de si tenían antecedentes de diabetes (Van den Berghe N Engl J Med., 345(19):1359, (2001)). Por lo tanto, las proteínas de la presente invención son las más apropiadas para ayudar a restaurar la estabilidad metabólica en pacientes metabólicamente inestables en estado crítico. Las proteínas de la invención tales como aquellas que contienen variantes de
15 FGF21 son únicas puesto que estimulan la absorción de glucosa y aumentan la sensibilidad a la insulina pero no inducen hipoglicemia.

- [000177] En otro aspecto de la presente invención, se contemplan las proteínas de la invención para uso como un medicamento para el tratamiento de la obesidad, diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad de hígado graso no
20 alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, infarto agudo de miocardio, afecciones asociadas con severas mutaciones inactivadoras en el receptor de la insulina, y otros trastornos metabólicos.

25 **Mutantes FGF21 Específicos a Sitio**

- [000178] En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de la invención incluyen mutantes FGF21 o análogos de FGF21 con aminoácidos no naturales.
- [000179] En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de la invención comprenden agonistas de FGF21 con una o más de las siguientes modificaciones adicionales de
30 FGF21 tipo silvestre:
- [000180] (i) disulfuros adicionales, aminoácidos no naturales, o modificaciones para promover la dimerización tal como la formación de un disulfuro en R154C o la introducción de una cisteína en otro sitio, o la dimerización a través de un dominio Fc

fusionado, o la formación de dímeros a través de un entrecruzador, tal como un PEG bifuncional;

[000181] (ii) fragmentos de FGF21;

[000182] (iii) proteínas seleccionadas por tener actividad FGF21 (unión a beta-Klotho y unión y activación de las FGFRs); y

[000183] (iv) un anticuerpo FGF21 mimético (de diversos formatos tales como Fab, UniBody®, svFc etc.).

[000184] En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de la invención comprenden uno o más de los siguientes enlazadores: un enlace de amida simple, péptidos cortos (particularmente repeticiones Ser/Gly), residuos adicionales desde la secuencia traducida FGF21, o un enlazador más grande hasta una proteína entera (tal como un dominio Fc, un fardo helicoidal fijador de HSA, HSA, etc.). Las dos fracciones también pueden unirse por otros medios químicos, tales como a través de aminoácidos no naturales o enlazadores químicos estándar (maleimida-Cys, NHS-Lys, clic, etc.)

[000185] Otras realizaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a los siguientes enlaces, para la extensión de vida media: unión de HSA a lípidos o moléculas pequeñas o micelios a bien sea la versión monomérica o la versión dimérica de la fusión.

[000186] En ciertas realizaciones de la invención, otros enlaces se pueden hacer a las proteínas, polipéptidos, y/o péptidos de la invención, para lograr extensión de la vida media y otras propiedades biológicas mejoradas. Estas pueden incluir fijación de conjugados de PEG-colesterol (incluyendo micelios y liposomas) a las proteínas, polipéptidos, y/o péptidos de la invención, y/o fijación de azúcares (glicosilato) a las proteínas, polipéptidos, y/o péptidos de la invención. En aún otras realizaciones, se emplean técnicas similares para añadir conjugados de, por ejemplo, ácido polisiálico (PSA), hidroxietil almidón (HES), ligandos de unión de albúmina, o escudos de carbohidratos a proteínas, polipéptidos, y/o péptidos.

[000187] La técnica de hesilación, por ejemplo, acopla cadenas de hidroxietilalmidón (HES) ramificado (60 kDa o 100 kDa, fragmentos de la amilopectina altamente ramificados de almidón de maíz) a una proteína, polipéptidos, y/o péptidos a través de alquilación reductora. Conjugados por polisialilación de proteínas, polipéptidos y/o péptidos de interés con polímeros de ácido polisiálico de manera similar a la PEGilación. Los polímeros de PSA son polímeros inmunogénicos con carga negativa que se producen naturalmente en el cuerpo y están disponibles en pesos moleculares de 10-50kD.

[000188] En aún otras realizaciones de la invención, otros enlaces o modificaciones se pueden hacer a las proteínas, polipéptidos, y/o péptidos de la invención, para lograr la vida media extendida y otras propiedades biológicas mejoradas. Estas incluyen la creación de grupos PEG recombinantes (rPEG), y su fijación a las proteínas, polipéptidos, y/o péptidos de la invención. Desarrollada por la empresa Amunix, Inc., tecnología rPEG se basa en secuencias de proteínas con propiedades tipo PEG que son genéticamente fusionadas a los productos biofarmacéuticos, evitando el paso de la conjugación química adicional. Los rPEGs son constructos de exenatida de vida media extendida que contienen una larga cola no estructurada de aminoácidos hidrófilos, y que son capaces de aumentar la vida media sérica de la proteína o péptido y retardar su tasa de absorción, reduciendo así la relación pico-valle significativamente. rPEGs tienen un radio hidrodinámico mayor y muestran un peso molecular aparente que es aproximadamente 15 veces su peso molecular actual, imitando la forma en que la pegilación logra una larga vida media sérica.

15

Polipéptidos FGF21 Truncados

[000189] Una realización del presente invento se refiere a las formas truncadas del polipéptido FGF21 maduro (SEQ ID NO: 3). Esta realización de la presente invención surgió de un esfuerzo para identificar polipéptidos de FGF21 truncados que son capaces de proporcionar una actividad que es similar, y en algunos casos superior, a formas no truncadas del polipéptido FGF21 maduro.

20

[000190] Tal como se utiliza en la presente, el término "polipéptido FGF21 truncado" se refiere a un polipéptido FGF21 en el que los residuos aminoácidos se han eliminado del extremo amino-terminal (o N-terminal) del polipéptido FGF21, o los residuos aminoácidos han sido retirados del extremo carboxilo-terminal (o C-terminal) del polipéptido FGF21, o los residuos aminoácidos han sido eliminados de los extremos amino-terminal y carboxilo-terminal del polipéptido FGF21. Los diferentes truncamientos divulgados en la presente se prepararon como se describe en este documento.

25

[000191] La actividad de polipéptidos FGF21 N-terminalmente truncados y polipeptidos FGF21 C-terminalmente truncados se puede probar utilizando un ensayo fosfo-ERK in vitro. Los detalles específicos de los ensayos in vitro que pueden utilizarse para examinar la actividad de los polipéptidos FGF21 truncados, se pueden encontrar en los ejemplos.

30

[000192] La actividad de los polipéptidos FGF21 truncados del presente invento también puede ser probada en un ensayo in vivo, tales como ratones ob/ob. En general, para evaluar la actividad in vivo de un polipéptido truncado FGF21, el polipéptido truncado FGF21 puede ser administrado por vía intraperitoneal a un animal de laboratorio. Después de un período de incubación deseado (por ejemplo, una hora o más), una muestra de sangre se puede extraer, y los niveles de glucosa en la sangre se pueden medir.

[000193] a. Truncamientos N-Terminales

[000194] En algunas realizaciones del presente invento, los truncamientos N-terminales comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 residuos aminoácidos desde el extremo N-terminal del polipéptido FGF21 maduro. Los polipéptidos truncados FGF21 que tienen truncamientos N-terminales de menos de 9 residuos aminoácidos conservan la capacidad del polipéptido FGF21 para bajar la glucosa en sangre en un individuo. En consecuencia, en las realizaciones particulares, el presente invento abarca formas truncadas del polipéptido FGF21 maduro o variantes proteicas del FGF21 que tienen truncamientos N-terminales de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 residuos aminoácidos.

[000195] b. Truncamientos C-Terminales

[000196] En algunas realizaciones del presente invento, los truncamientos C-terminales comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos aminoácidos del extremo C-terminal del polipéptido FGF21 maduro. Los polipéptidos truncados FGF21 que tienen truncamientos C-terminales de menos de 13 residuos aminoácidos mostraron una eficacia de al menos 50% la eficacia de FGF21 tipo silvestre en un ensayo ELK-luciferasa in vitro (Yie J. FEBS Letts 583:19-24 (2009)), que indica que estos mutantes FGF21 conservan la capacidad del polipéptido FGF21 maduro para reducir la glucosa en la sangre de un individuo. En consecuencia, en las realizaciones particulares, el presente invento abarca formas truncadas del polipéptido FGF21 maduro o variantes proteicas del FGF21 con truncamientos C-terminales de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 residuos aminoácidos.

[000197] c.Truncamientos N-terminales y C-terminales

[000198] En algunas realizaciones de la presente invención, los polipéptidos truncados FGF21 pueden tener una combinación de truncamientos N-terminales y C-terminales. Los polipéptidos FGF21 truncados que tienen una combinación de truncamientos N-terminales y C-terminales comparten la actividad de los correspondientes polipéptidos truncados FGF21 que tienen ya sea los truncamientos N-terminales o C-terminales solos.

En otras palabras, los polipéptidos truncados FGF21 que tienen ambos truncamientos N-terminales de menos de 9 residuos aminoácidos y truncamientos C-terminales de menos de 13 residuos aminoácidos poseen igual o mayor actividad de reducción de glucosa en sangre que los polipéptidos FGF21 truncados que tienen truncamientos N-terminales de menos de 9 residuos aminoácidos o polipéptidos truncados FGF21 que tienen de truncamientos C-terminales de menos de 13 residuos aminoácidos. En consecuencia, en realizaciones particulares, el presente invento abarca formas truncadas del polipéptido FGF21 maduro o variantes proteicas del FGF21 que tienen ambos truncamientos C-terminales de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 residuos aminoácidos y truncamientos C-terminales de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos aminoácidos.

- [000199]** Al igual que con todos los variantes del FGF21 del presente invento, los polipéptidos truncados FGF21 pueden comprender opcionalmente un residuo de metionina amino-terminal, que puede ser introducido por la mutación dirigida o como resultado de un proceso de expresión bacteriana.
- [000200]** Los polipéptidos FGF21 truncados del presente invento pueden prepararse como se describe en los ejemplos descritos en este documento. Los expertos en el estado de la técnica, familiarizados con las técnicas estándares de biología molecular, pueden emplear ese conocimiento, junto con la divulgación inmediata, para hacer y usar los polipéptidos truncados FGF21 del presente invento. Técnicas estándares pueden utilizarse para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos, cultivo de tejidos, y la transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, supra, que se incorpora en la presente como referencia para cualquier propósito. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación pueden realizarse de acuerdo a las especificaciones del fabricante, como comúnmente se realiza en el estado de la técnica, o como se describe aquí. A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica en este documento son bien conocidos y de uso común en el estado de la técnica. Técnicas estándares pueden utilizarse para la síntesis química, análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación y liberación, y el tratamiento de los pacientes.

[000201] Los polipéptidos FGF21 truncados del presente invento también se pueden fusionar a otra entidad, que puede impartir propiedades adicionales al polipéptido FGF21 truncado. En una realización del presente invento, un polipéptido truncado FGF21 puede

ser fusionado a un dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), Albúmina Sérica Humana (ASH), o polipéptidos fijadores de albúmina. Dicha fusión se puede realizar utilizando métodos conocidos de la biología molecular y/o la orientación proporcionada en este documento. Los beneficios de tales polipéptidos de fusión, así como los métodos para la preparación de dichos polipéptidos de fusión, se discuten en mayor detalle en este documento.

Proteínas de Fusión FGF21

[000202] Como se utiliza en la presente, el término "polipéptido de fusión FGF21" o "proteína de fusión FGF21" se refiere a la fusión de uno o más residuos aminoácidos (por ejemplo, una proteína heteróloga o péptido) en el extremo N-terminal o C-terminal de cualquier variante proteico FGF21 descrito en este documento.

[000203] Las proteínas de fusión FGF21 se pueden hacer mediante la fusión de secuencias heterólogas, ya sea en el extremo N o en el extremo C de, por ejemplo, un variante proteico FGF21, como se definió en la presente. Como se describe en este documento, una secuencia heteróloga puede ser una secuencia aminoácida o un polímero que no contiene aminoácidos. Las secuencias heterólogas pueden fusionarse, ya sea directamente al variante proteico FGF21 o mediante una molécula enlazadora o adaptadora. Una enlazadora o adaptadora puede ser uno o más residuos aminoácidos (o-mers), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 residuos (o-mers), preferentemente de 10 a 50 residuos aminoácidos (o-mers), por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 residuos (o - mers), y más preferiblemente de 15 a 35 residuos aminoácidos (o-mers). Una molécula enlazadora o adaptadora también puede ser diseñada con un sitio de escisión para una endonucleasa de restricción de ADN o para una proteasa para permitir la separación de las fracciones fusionadas.

[000204] Péptidos y polipéptidos heterólogos incluyen, pero no se limitan a, un epítipo para permitir la detección y/o aislamiento de un variante proteico de FGF21, una proteína del receptor transmembrana o una parte de la misma, tal como un dominio extracelular o un dominio de transmembrana e intracelular; un ligando o una porción del mismo, que se une a una proteína receptora de transmembrana, una enzima o parte de ella la cual es catalíticamente activa, un polipéptido o un péptido que promueve la oligomerización, como un dominio de cremallera de leucina, un polipéptido o péptido que aumenta la estabilidad, tal como una región constante de la inmunoglobulina, un anticuerpo funcional o no funcional, o una cadena pesada o ligera del mismo, y un

polipéptido que tiene una actividad, tal como una actividad terapéutica, a diferencia de los variantes proteicos FGF21 de la presente invención. El presente invento también contempla los mutantes de FGF21 fusionados a la albúmina sérica humana (ASH).

5 **[000205] a. Fusiones Fc**

[000206] En una realización del presente invento, un variante proteico de FGF21 se fusiona con uno o más dominios de una región Fc de la IgG humana. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se fija a un antígeno, y un dominio constante conocido como "Fc", que
10 está involucrado en las funciones efectoras, como la activación del complemento y el ataque de las células fagocíticas. Un Fc tiene una larga vida media sérica, mientras que un Fab tiene una vida corta (Capon, 1989, Nature 337: 525-31). Cuando se unen con una proteína terapéutica, un dominio Fc puede proporcionar una mayor vida media o incorporar funciones tales como la unión del receptor Fc, unión de proteínas A, fijación
15 de complemento, y quizás incluso la transferencia de la placenta (Capon, 1989).

[000207] A lo largo de la divulgación, Fc-FGF21 se refiere a una proteína de fusión en la cual la secuencia Fc se fusiona con el extremo -N del FGF21. Del mismo modo, a través de la divulgación, FGF21-Fc se refiere a una proteína de fusión en la que la secuencia Fc se fusiona al extremo C del FGF21.

20 **[000208]** Realizaciones preferidas de la invención son proteínas de fusión de Fc-FGF21 que comprenden variantes de FGF21 como se definen en la presente. Realizaciones particularmente preferidas son proteínas de fusión de Fc-FGF21 que comprende un fragmento Fc modificado (ej., un FcLALA) y variantes de FGF21 como se definió en la presente.

25 **[000209]** La proteína de fusión puede purificarse, por ejemplo, mediante el uso de una columna de afinidad de Proteínas A. Se ha encontrado que los péptidos y proteínas fusionados a una región Fc exhiben una vida media sustancialmente mayor in vivo que sus contrapartes sin fusionar. Además, una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una
30 región Fc de origen natural, o se puede modificar para mejorar ciertas cualidades, como las cualidades terapéuticas, el tiempo de circulación, o la agregación reducida.

[000210] Modificaciones útiles de los agentes terapéuticos por fusión con el dominio "Fc" de un anticuerpo son discutidos en detalle en la Publicación PCT No. WO

00/024782. Este documento discute la unión a un “vehículo” tal como glicol de polietileno (PEG), dextrano, o una región Fc.

[000211] b. Enlazadores de Proteínas de Fusión

[000212] Cuando se forman las proteínas de fusión de la presente invención, un
5 enlazador puede, pero no necesita, ser empleado. Cuando está presente, la estructura química del enlazador puede no ser crítica, ya que sirve principalmente como un espaciador. El enlazador puede estar formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones de la presente invención, el enlazador se compone de 1 a 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, en donde los aminoácidos son
10 seleccionados a partir de los 20 aminoácidos naturales. En varias realizaciones, los 1 al 20 aminoácidos son seleccionados a partir de los aminoácidos glicina, serina, asparagina alanina, prolina, glutamina y lisina. En algunas realizaciones, un enlazador está formado por una mayoría de aminoácidos que son estéricamente impedidos, tales como glicina y alanina. En algunas realizaciones, los enlazadores son poliglicinas, polyalaninas,
15 combinaciones de glicina y alanina (tales como poli (Gly-Ala)), o una combinación de glicina y serina (como poli(Gly-Ser)). Mientras que un enlazador de 15 residuos aminoácidos se ha encontrado funciona especialmente bien para las proteínas de fusión FGF21, el presente invento contempla enlazadores de cualquier longitud o composición.
[000213] Los enlazadores descritos en este documento son de ejemplo, y los
20 enlazadores que son mucho más largos y que incluyen otros residuos se contemplan en la presente invención. Los enlazadores no peptídicos también se contemplan en la presente invención. Por ejemplo, enlazadores de alquilo pueden utilizarse. Estos enlazadores de alquilo pueden además sustituirse por cualquier grupo que no produzca impedimento estérico, incluyendo pero sin limitar a, un alquilo inferior (por ejemplo, C1-C6), acilo
25 inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH₂, o fenilo. Un enlazador no peptídico de ejemplo es un enlazador de polietilenglicol, en donde el enlazador tiene un peso molecular de 100 a 5000 kD, por ejemplo, 100 a 500 kD.

[000214]

30 **Proteínas de Fusión Químicamente Modificadas**

[000215] Formas químicamente modificadas de las proteínas de fusión descritas en este documento, pueden ser preparadas por un experto en el estado de la técnica, dadas las divulgaciones descritas en la presente. Tales Proteínas de Fusión químicamente modificadas se alteran de tal manera que el mutante modificado químicamente difiere del

mutante no modificado, ya sea en el tipo o la localización de las moléculas fijadas de manera natural al mutante. Los mutantes químicamente modificados pueden incluir moléculas formadas por la supresión de uno o más grupos químicos naturalmente fijados.

[000216] En una realización, las proteínas de la presente invención pueden modificarse por la unión covalente de uno o más polímeros. Por ejemplo, el polímero seleccionado es típicamente soluble en agua para que la proteína a la que se fija no se precipite en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Incluidos en el ámbito de los polímeros adecuados está una mezcla de polímeros. Preferentemente, para el uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable. Polímeros no solubles en agua conjugados a proteínas de la presente invento también constituyen un aspecto de la invención.

[000217] Los polímeros de ejemplo cada uno puede ser de cualquier peso molecular y pueden ser ramificados o no. Los polímeros cada uno suelen tener un peso molecular medio de entre aproximadamente 2 kDa a 100 kDa (el término "aproximadamente" que indica que en las preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más y algunas menos que el peso molecular indicado). El peso molecular medio de cada polímero es preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa y 50kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa, y más preferiblemente entre aproximadamente 20 kDa y alrededor de 35 kDa.

[000218] Polímeros solubles en agua apropiados o mezclas de los mismos incluyen, pero no están limitados a, carbohidratos N-enlazados o O enlazados, azúcares, fosfatos, glicol polietileno (PEG) (incluyendo las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar proteínas, incluyendo mono - (C1-C10), alcoxi, ariloxi-polietilenglicol), monometoxi-polietilenglicol, dextrano (por ejemplo, dextrano de bajo peso molecular, por ejemplo, alrededor de 6 kD), celulosa, y otros polímeros basados en carbohidratos, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de glicol de propileno, óxido de propileno/co-polímeros de óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), y alcohol polivinílico. El presente invento también contempla moléculas bifuncionales de entrecruzamiento que se pueden utilizar para preparar multímeros variantes proteicos del FGF21 fijados de manera covalente. El presente invento también contempla mutantes de FGF21 covalentemente fijados al ácido polisiálico.

[000219] Los polímeros polisacáridos son otro tipo de polímero soluble en agua que puede utilizarse para la modificación de proteínas. Por lo tanto, las proteínas de fusión

de la presente invención fusionadas a un polímero polisacárido forman realizaciones de la presente invención. Los dextrans son polímeros de polisacáridos compuestos de subunidades individuales de glucosa predominantemente enlazadas por 1-6 enlaces alfa. El dextrano por sí mismo está disponible en muchos rangos de peso molecular, y está

5 fácilmente disponible en pesos moleculares entre 1 kD y 70 kD aproximadamente. El dextrano es un polímero soluble en agua adecuado para utilizar como un vehículo por sí solo o en combinación con otro vehículo (por ejemplo, Fc). Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N ° WO 96/11953. El uso de dextrano conjugado con inmunoglobulinas terapéuticas o diagnósticas, se ha informado. Véase, por ejemplo, la

10 Publicación de Patente Europea No. 0 315 456, la cual se incorpora en la presente como referencia. El presente invento también contempla el uso de dextrano de alrededor de 1 kD a alrededor de 20 kD.

[000220] En general, la modificación química se puede realizar bajo cualquier condición adecuada utilizada para reaccionar una proteína con una molécula polimérica

15 activada. Los métodos para preparar polipéptidos modificados químicamente por lo general comprenden las etapas de: (a) hacer reaccionar el polipéptido con la molécula polimérica activada (tal como un éster reactivo o un derivado aldehído de la molécula polimérica), bajo condiciones en las que un variante proteico de FGF21 resulta unido a una o más moléculas poliméricas, y (b) la obtención de los productos de reacción. Las

20 condiciones óptimas de reacción se determinan en función de parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción de las moléculas poliméricas a la proteína, mayor es el porcentaje de molécula polimérica fijada. En una realización del presente invento, los mutantes FGF21 químicamente modificados pueden tener una sola fracción de molécula polimérica en el extremo amino (véase, por ejemplo,

25 Pat. EE.UU N ° 5234784)

[000221] En otra realización de la presente invención, las proteínas de la invención pueden ser químicamente acopladas a biotina. La biotina/proteínas de la invención luego se dejan fijar a avidina, dando como resultado avidina/biotina/Proteínas tetravalentes de la invención. Las proteínas de la invención también pueden ser covalentemente

30 acopladas a dinitrofenol (DNP) o trinitrofenol (TNP) y los conjugados resultantes precipitados con anti-DNP o anti-TNP-IgM para formar conjugados decaméricos con una valencia de 10.

[000222] En general, las condiciones que pueden ser aliviadas o moduladas por la administración de los presentes mutantes de FGF21 modificados químicamente incluyen

aquellas descritas en este documento para Proteínas de la invención. Sin embargo, los
mutantes de FGF21 químicamente modificados divulgados en la presente pueden tener
actividades adicionales, actividad biológica aumentada o reducida, u otras características,
tales como vida media aumentada o disminuida, en comparación con mutantes de FGF21
5 no modificados.

Composiciones Terapéuticas de Proteínas de Fusión y Su Administración

[000223] La presente invención también proporciona composiciones terapéuticas que
comprenden una o más de las proteínas de fusión de la invención descritas en la presente
10 y en mezcla con un agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente
aceptable o vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado para idoneidad con el
modo de administración. Las composiciones se contemplan específicamente a la luz de,
por ejemplo, la identificación de proteínas de fusión que presentan propiedades
mejoradas.

15 [000224] En algunas realizaciones las composiciones farmacéuticas se preparan como
inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas
para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección también se
pueden preparar. Los liposomas son incluidos en la definición de un vehículo
farmacéuticamente aceptable. Sales farmacéuticamente aceptables también pueden estar
20 presentes en la composición farmacéutica, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales
como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, etc., y las sales de ácidos orgánicos
tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, etc. Una discusión completa de
excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington: The Science
and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams y Wilkins.

25 [000225] Los materiales de la formulación aceptable preferiblemente no son tóxicos
para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas.

[000226] La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para
modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la
claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, estabilidad, velocidad de
30 disolución o liberación, absorción, o penetración de la composición. Materiales
adecuados de formulación incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como la
glicina, glutamina, asparagina, arginina, o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tales
como el ácido ascórbico, sulfito de sodio, o hidrógeno-sulfito de sodio), buffers (tales
como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos), agentes

de dilución (como manitol o glicina), agentes quelantes (como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)), agentes formadores de complejos (como la cafeína, la polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), rellenos, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (como la glucosa, manosa, o dextrinas), proteínas (como la albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas), agentes colorantes, aromatizantes y de dilución, agentes emulsionantes, polímeros hidrofílicos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones que forman sales (como el sodio), conservantes (como el cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, el timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico, o peróxido de hidrógeno), solventes (como glicerina, glicol de propileno, o polietilenglicol), alcoholes de azúcar (como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, surfactantes o agentes humectantes (como Pluronic; PEG; ésteres de sorbitan, polisorbato tales como polisorbato 20 o polisorbato 80; tritón, trometamina, lecitina, colesterol o tiloxapal), agentes mejoradores de estabilidad (por ejemplo, sacarosa o sorbitol), agentes mejoradores de la tonicidad (por ejemplo, haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio; sorbitol manitol), vehículos de liberación, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a ed., AR Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990), y las ediciones posteriores de la misma, incorporada en la presente como referencia para cualquier propósito).

[000227] La composición farmacéutica óptima será determinada por un experto en el estado de la técnica dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración, formato de liberación, y la dosis deseada (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, arriba). Estas composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación in vivo, y la tasa de depuración in vivo de la proteína de fusión de la invención.

[000228] El principal vehículo en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo adecuado para la inyección puede ser agua, solución salina fisiológica, o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina amortiguada neutral o solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos de ejemplo adicionales. Otras composiciones farmacéuticas de ejemplo comprenden el buffer Tris con pH de alrededor de 7.0-8.5, o buffer de acetato con pH 4.0 a 5.5, que puede incluir además sorbitol o un

sustituto adecuado. En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas de función dual pueden prepararse para el almacenamiento mediante la mezcla de la composición seleccionada con el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, arriba) en la forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, la proteína de función dual puede formularse como un liofilizado con excipientes adecuados, tales como la sacarosa.

5 [000229] Las composiciones farmacéuticas que contienen las proteínas de fusión de la invención pueden seleccionarse para administración parenteral. Por otra parte, las composiciones pueden seleccionarse para la inhalación o para la liberación a través del tracto digestivo, por vía oral por ejemplo. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptable está en el conocimiento del estado de la técnica.

10 [000230] Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, se utilizan buffers para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, por lo general dentro de un rango de pH de 5 a 8.

[000231] Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para utilizar en este invento pueden estar en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos que comprende la proteína de función dual deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo especialmente adecuado para la inyección parenteral es agua destilada estéril en donde se formula una proteína de función dual como una solución estéril, isotónica y preservada de manera adecuada. Sin embargo, otra preparación puede involucrar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (como el ácido poliláctico o ácido poliglicólico), esferas, o liposomas, que proporciona la liberación controlada o sostenida del producto, que puede ser liberado a través de una inyección de depósito. El ácido hialurónico también puede utilizarse, y este puede tener el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. Otros medios apropiados para la introducción de la molécula deseada incluyen los dispositivos implantables de administración de fármacos.

20 [000232] En una realización, una composición farmacéutica puede formularse para la inhalación. Por ejemplo, una proteína de función dual de la invención puede formularse como un polvo seco para inhalación. Las soluciones de inhalación de proteínas de función dual también se pueden formular con un propulsor para liberación en aerosol. En aún otra realización, las soluciones pueden ser nebulizadas. La administración

pulmonar se describe con más detalle en la Publicación Internacional N ° WO 94/20069, que describe la administración pulmonar de las proteínas modificadas químicamente.

[000233] También se contempla que ciertas formulaciones pueden ser administradas por vía oral. En una realización de la presente invención, las Proteínas de Fusión de la invención que se administran de esta manera se pueden formular con o sin los vehículos habitualmente utilizados en la composición de formas de dosificación sólidas tales como tabletas y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula puede ser diseñada para liberar la porción activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y la degradación pre-sistémica se reduce al mínimo. Agentes adicionales pueden ser incluidos para facilitar la absorción de las proteínas de fusión de la invención. Diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de tabletas, y aglutinantes también se pueden emplear.

[000234] Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de las proteínas de fusión de la invención en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de las tabletas en agua estéril u otro medio adecuado, las soluciones pueden ser preparadas en forma de dosis unitarias. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio o bicarbonato, lactosa o fosfato de calcio, o aglomerantes, tales como almidón, gelatina o goma arábica; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco.

[000235] Composiciones farmacéuticas adicionales que comprenden Proteínas de Fusión de la invención será evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican Proteínas de Fusión de la invención en formulaciones de liberación sostenida o controlada. Técnicas para la formulación de una variedad de medios de liberación sostenida o controlada, tales como vehículos de liposoma, micropartículas bio-erosionables o esferas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidos por los expertos en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N ° WO.93/15722, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la liberación de composiciones farmacéuticas, y Wischke & Schwendeman, 2008, Int J Pharm 364: 298-327, y Freiberg y Zhu, 2004, Int. J. Pharm. 1-18, donde se trata la preparación y uso de microesferas/micropartículas). J Pharm. 364: 298-327, y Freiberg & Zhu, 2004, Int. J Pharm. 282: 1-18, que discuten la preparación y uso de microesferas/micropartículas).

[000236] Otros ejemplos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos formados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (Pat. EE.UU. No. 3,773,919 y la patente europea No. 0 058 481),
5 copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman, 1983, 22 Biopolímeros 22: 547-56), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer, 1981, J. Biomed Mater Res 15: 167-277 y Langer, 1982, Chem Tech 12. 98-105), vinyl acetato de etileno (Langer, arriba) o ácido poli-D-3-hidroxibutírico (Patente Europea No. 0 133 988). Las composiciones de liberación sostenida pueden incluir también los liposomas, que pueden
10 prepararse por uno de varios métodos conocidos en el estado de la técnica. Véase, por ejemplo, Epstein, 1985, Proc. Natl. Acad. Ciencia. U.S.A. 82: 3688-92, y la Patente Europea N ° 0 036 676 0 088 046 y 0 949 143. 3688-92; Patentes Europeas No. 0 036 676, 0 088 046, y 0 143 949.

[000237] Las composiciones farmacéuticas de la invención que va a utilizarse para la
15 administración in vivo normalmente deben ser estériles. Esto se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Donde la composición es liofilizada, la esterilización que utiliza este método se puede realizar ya sea antes o después de liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral puede ser almacenada en forma liofilizada o en solución. Además, las
20 composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tenga un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón bloqueador que pueda ser perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

[000238] Una vez que la composición farmacéutica ha sido formulada, puede ser almacenada en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o en
25 forma de polvo deshidratado o liofilizado. Estas formulaciones se pueden almacenar en una forma fácil de usar, o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere de una reconstitución antes de su administración.

[000239] En una realización concreta, el presente invento se refiere a los kits para la producción de una unidad de administración de dosis única. Los kits pueden contener
30 tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca y un segundo recipiente con una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de este invento los kits que contienen una o varias jeringas pre-cargadas de cámara única o múltiple (por ejemplo, jeringas líquidas o liojeringas).

Dosificaciones de Proteínas de Fusión y Su Administración

- [000240] La cantidad efectiva de una composición farmacéutica de la invención a ser empleada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y objetivos. Un experto en el estado de la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento por lo tanto pueden variar dependiendo, en parte, de la molécula liberada, la indicación para la cual el variante de proteína de fusión es utilizado, la vía de administración, y el tamaño (peso corporal, la superficie del cuerpo, o el tamaño del órgano) y la condición (edad y salud general) del paciente. En consecuencia, el médico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede oscilar entre 0,1 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación pueden oscilar entre 0.1 $\mu\text{g/kg}$ y 100 mg/kg aproximadamente; o 1 $\mu\text{g/kg}$ hasta 100 mg/kg.
- [000241] La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de función dual en la formulación que se utiliza. Por lo general, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación para lograr el efecto deseado. La composición por lo tanto, se puede administrar como una sola dosis, como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a través del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implante o catéter. El refinamiento adicional de la dosificación adecuada es realizado de manera rutinaria por los expertos en el estado de la técnica y se encuentra dentro del ámbito de las tareas de rutina realizadas por ellos. Las dosis apropiadas se pueden determinar a través del uso de datos apropiados dosis-respuesta.
- [000242] La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral, mediante inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, o intralesional, por los sistemas de liberación sostenida (que también se pueden inyectar), o por los dispositivos de implantación. Si así se desea, las composiciones se pueden administrar por inyección en bolo o por infusión continua o mediante un dispositivo de implantación.
- [000243] Alternativa o adicionalmente, la composición puede ser administrada localmente a través de la implantación de una membrana, una esponja, u otro material apropiado sobre el cual la molécula deseada se ha absorbido o encapsulado. Cuando un dispositivo de implante se utiliza, el dispositivo puede ser implantado en cualquier tejido

u órgano adecuado, y la liberación de la molécula deseada puede ser a través de difusión, bolo de liberación programada, o la administración continua.

Usos Terapéuticos de las Proteínas de Fusión

- 5 **[000244]** Las proteínas de la invención pueden utilizarse para tratar, diagnosticar, aliviar o prevenir una serie de enfermedades, trastornos o afecciones, incluyendo pero sin limitar a trastornos metabólicos. En una realización, el trastorno metabólico a tratar es diabetes, ej., diabetes mellitas tipo 2. En otra realización, el trastorno metabólico es la
- 10 diabetes mellitus tipo 1, pancreatitis, dislipidemia, enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, infarto agudo del miocardio, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, enfermedad arterial periférica, accidente cerebro vascular, insuficiencia cardíaca,
- 15 enfermedad coronaria, enfermedad renal, complicaciones de la diabetes, neuropatía, trastornos asociados con mutaciones inactivadoras severas en el receptor de insulina, gastroparesia y otros trastornos metabólicos.

- [000245]** En la práctica, un trastorno o enfermedad, tales como diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2 o la obesidad se pueden tratar mediante la administración de un variante proteico
- 20 de FGF21 como se describe en la presente a un paciente que lo necesita en la cantidad de una dosis terapéuticamente eficaz. La administración puede realizarse como se describe en este documento, por ejemplo mediante inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, intramuscular o por vía oral en forma de un comprimido o formación líquida. En la mayoría de los casos, una dosis deseada puede ser determinada por un
- 25 médico, tal como se describe en este documento, y puede representar una dosis terapéuticamente eficaz del polipéptido mutante de FGF21. Será evidente para los expertos en el estado de la técnica que una dosis terapéuticamente eficaz del polipéptido mutante de FGF21 dependerá, entre otras cosas, del esquema de administración, la dosis unitaria de antígeno administrado, si la molécula de ácido nucleico o polipéptido se
- 30 administra en combinación con otros agentes terapéuticos, el estado inmune y la salud del receptor. El término "dosis terapéuticamente eficaz", como se utiliza en la presente, significa la cantidad del polipéptido mutante de FGF21 que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema de tejido, animal o humano que busca el

investigador, médico, u otro clínico, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se trata.

5 **[000246]** Habiendo descrito el presente invento en detalle, el mismo se entiende con mayor claridad en relación con los siguientes ejemplos, que se incluyen para fines de ilustración solamente y no pretenden ser limitativos del invento.

10 **[000247]** La práctica del presente invento empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, en el conocimiento del estado de la técnica. Tales técnicas se explican con detalle en la literatura. Véase, por ejemplo, Remington 's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990), Methods In Enzymology (Colowick S. y N. Kaplan, editores, Academic Press, Inc.), y Handbook of Experimental Immunology, Vols. IIV (DM Weir y CC Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications.), Y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a edición, 1989).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de las Proteínas Variantes de FGF21

20 **[000248] Constructo de expresión de la proteína FGF21 V76:** Las variantes de FGF21 se clonaron en el vector de expresión pET30a de *E. coli* modificado, descrito por Achmuller et al. (2007) (Nature Methods 4:1037-1043), para generar fusiones en el marco de lectura unidos a un segmento etiquetado con una hexa-histidina seguido por la etiqueta de N^{pro}-EDDIE en el extremo N-terminal de FGF21 (aa 33 - 209).

25 **[000249] Expresión y purificación de FGF21 V76:** El plásmido de expresión pET30a-His-N^{pro}-EDDIE-FGF21 se transformó en células competentes BL21 Star (DE3) de *E. coli* (Invitrogen). Se llevó a cabo el crecimiento de las células recientemente transformadas a partir de una sola colonia durante toda una noche, esto se realizó empleando 50 mL de caldo Terrific Broth (TB) que contiene 50 µg / mL de kanamicina a 37 ° C. El precultivo se transfirió a 1 L de medio TB con kanamicina y se cultivaron en
30 matraces con deflector en 37 ° C WITH agitación a 250 rpm. Después de 6 horas de cultivo, la expresión de FGF21 se indujo por la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM, y los cultivos se hicieron crecer durante la noche a 37 ° C. Las células se recogieron a continuación y se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis enfriado con

hielo; 50 mM de Tris-HCl, pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, seguido por la lisis usando un microfluidificador™.

[000250] Los cuerpos de inclusión (CI) se precipitaron mediante centrifugación a 30.000 x g durante 1 hora a 4° C. Los CI se lavaron con Tris -HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM y después se disolvieron en 30 mL de solución tampón de disolución; Tris - HCl 10 mM, pH 8, NaH₂PO₄ 100 mM, GnHCl 6 M. Los CI disueltos fueron aclarados por centrifugación a 30.000 x g durante 1 hora a 25° C. La solución de CI se cargó en una columna de 5 mL de resina de alto rendimiento de Ni-NTA (GE Healthcare) equilibrada con el tampón de disolución. Las proteínas unidas a la resina se eluyeron mediante la disminución del pH a 4.5. El eluato se acondicionó mediante el ajuste de pH y la adicionando ditioneitol (DTT) a una concentración de 20 mM. El eluato acondicionado se diluyó lentamente en 1 L de tampón de replegamiento; Tris-HCl 50 mM, pH 8, arginina 0.5 M, DTT 20 mM, seguido de incubación durante 2 días a 4° C. La muestra diluida se concentró y se le hizo un intercambio de tampón de Tris- HCl 20 mM , pH 9 usando un método de ultrafiltración. La muestra concentrada se cargó en una columna 10 mL de resina de flujo rápido de Q Sepharose (GE Healthcare) equilibrada con Tri – HCl 20 mM (pH 9).

[000251] Después de lavar la resina con el tampón de equilibrio, las proteínas unidas a la resina se eluyeron con Tris - HCl 20 mM, pH 9, NaCl 500 mM. Para eliminar el fragmento de fusión His-N^{pro} escindido y cualquier proteína de fusión no escindida de la proteína FGF21 replegada, el eluato se cargó en una columna de 5 mL de resina de alto rendimiento de Ni-NTA equilibrada con Tris 20 mM, pH 8.0, imidazol 50 mM, y se recogió la fracción de flujo pasante que contiene FGF21. Para reducir los niveles de endotoxinas, la fracción de FGF21 se trató con una resina de Endo Trap HD (Hyglos) equilibrada con Tris 10 mM, pH 8, imidazol 50 mM, NaCl 500 mM, CaCl₂ 1 mM. La muestra con baja concentración de endotoxina se dializó a contra PBS y después se esterilizó con un filtro de 0.22 µm. La proteína FGF21 purificada se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80° C. La concentración de proteína se determinó por absorbancia a 280 nm utilizando 9362 M⁻¹ cm⁻¹ como el coeficiente de extinción molar para FGF21. La pureza e integridad de la proteína se determinaron por HPLC, SDS-PAGE y cromatografía líquida – espectrometría de masas.

[000252] **PEGilación mediada por cisteína de las variantes de FGF21:** La variante V76 (R154C) de FGF21 tiene la tendencia de dimerizarse mediante cisteína modificada por ingeniería, por lo tanto, antes de la PEGilación la solución de proteína (normalmente

5 mg / mL en tampón Tris) fue ligeramente reducido con mercaptoetilamina 5 mM durante 30 minutos en hielo e inmediatamente desalada en Tris 20 mM, pH 7. La proteína recién reducida (típicamente de 3 mg / mL) fue entonces inmediatamente PEGilada con 1.5 equivalentes de reactivo ramificado de maleimido-PEG de 40kDa (NOF, Cat. # GL2-400MA de las series Sunbright) durante 3 horas en hielo. La proteína PEGilada se purificó finalmente por cromatografía de intercambio aniónico (MonoQ) con rendimientos globales de aproximadamente el 25%.

[000253] Constructos de expresión para las variantes de fusión Fc-FGF21: El ADNc para la variantes humanas de FGF21 que codifica los aminoácidos 33 - 209 fueron clonados en un vector mamífero de expresión corriente abajo del promotor del citomegalovirus (CMV) alineado con el marco de lectura con las secuencias N-terminales incluyendo un péptido líder (cadena kappa de inmunoglobulina) para dirigir la secreción de proteínas seguidas por un dominio Fc y un enlazador corto.

[000254] Expresión y purificación de las variantes de Fc-FGF21: Las proteínas variates Fc-FGF21 se expresaron en células HEK293T (American Type Culture Collection). Las células fueron cultivadas en suspensión de cultivo a 37 ° C, 8% de CO₂, en medio de expresión Freestyle 293 (Invitrogen, Cat. # 12338-018) hasta el día de la transfección. Las células se centrifugaron a 1000 x g durante 7 min en un rotor de cubeta oscilante y se contaron usando un contador de células automatizado. Las células se diluyeron en 900 mL de medio de cultivo Freestyle 293 hasta una concentración final de 1.4×10^6 células / mL y se colocaron en un matraz de 3 L sin deflectores (Corning, Cat. # 431252). Las células se transfectaron usando una mezcla de polietileneimina (PEI) y plásmido de la siguiente manera: Tres mL de una solución stock de PEI lineal y esteril con peso molecular de 25.000 y una concentración de 1 mg / mL (Alfa Aesar, Cat. # 43896) fueron añadidos a 50 mL de medio de cultivo Freestyle 293, se mezcló suavemente y se incubó a 25 ° C durante 5 minutos. Al mismo tiempo, se añadió 1 mg de plásmido libre de endotoxinas a 50 mL de medio de cultivo Freestyle 293 y se realizó una filtración de manera estéril utilizando un filtro de 0.22 µm. Después se añadió la mezcla de PEI al ADN filtrado esterilmente, se mezcló suavemente y se dejó incubar a 25 ° C durante 10 minutos. Posteriormente, la mezcla de PEI-plásmido se añadió al matraz de 3 L que contiene las células HEK 293T diluidas y se colocó en una incubadora de agitación a 125 RPM, 37 ° C, 8% de CO₂.

[000255] En el día 6 después de la transfección, las células se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se recogió. El sobrenadante se clarificó por filtración a través de un filtro de 0.8/0.2 µm (Pall Corporation, Cat. # 4628).

[000256] La purificación de lotes de la proteína FGF21 se realizó mediante la adición de 1 mL de proteína A recombinante Sepharose Fast Flow (GE, Cat. # 17-5138-03) por 20 mg de proteína que se espera sea purificada, directamente al sobrenadante clarificado e incubando durante 1 hora a 4 ° C con rotación suave. La mezcla sobrenadante se vertió sobre una columna de cromatografía de Poly-Prep desechable (Bio-Rad, Cat. # 731-1550) y se descartó el material que pasó a través. Las perlas retenidas se lavaron con 5 volúmenes de columna de DPBS, pH 7.4 (Invitrogen, Cat. # 14190-144). La elución de la proteína de las perlas de proteína A se llevó a cabo mediante la adición de 20 volúmenes de columna de tampón de citrato de sodio 50 mM, pH 3.0. El tampón de elución se neutralizó mediante la adición de 20% de tampón de Tris - HCl, pH 9,0. La cromatografía de exclusión de tamaño se realizó como una etapa de pulido secundaria mediante la corrida del material purificado del lote de Proteína A a través de una columna de alta carga de 26/600 de Superdex 200pg (GE, Cat. # 28-9893-36). El rendimiento de proteína purificada se cuantificó por A280. SDS-PAGE se llevó a cabo para verificar la pureza y el peso molecular. El nivel de endotoxina se cuantificó usando el sistema de Endosafe PTS (Charles River Labs).

20

Ejemplo 2: Medición de la captación de 2-desoxiglucosa (2-DOG) dependiente de FGF21

[000257] La proteína FGF21 ha demostrado que estimula la captación de glucosa en adipocitos de ratón 3T3-L1 en presencia y ausencia de insulina, y la disminución de niveles preprandiales y posprandiales de glucosa en sangre, triglicéridos, y niveles de glucagón en ratones *ob / ob* y *db / db* y en ratas ZDF de 8 semanas de edad en una manera dependiente de la dosis, por lo tanto, ha proporcionado la base para el uso de FGF21 como una terapia para el tratamiento de la diabetes y la obesidad (véase, por ejemplo, la publicación de patente WO03/011213, y Kharitononkov et al., (2005) Jour.of Clinical Invest. 115:1627-1635). Además, se observó que FGF21 estimula la fosforilación de tirosina de FGFR-1 y FGFR-2 en los adipocitos 3T3-L1.

30

[000258] Los fibroblastos 3T3-L1 se adquirieron de ATCC (N ° de Cat. CL173). Las células se cultivaron hasta la confluencia en una caja de Petri de 150 cm² y se mantuvieron en DMEM con alto contenido de glucosa (Invitrogen, Cat. # 11995065)

suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina durante 4 días adicionales. Después las células se diferenciaron en el medio anterior suplementado con 4 mg / ml de insulina (Sigma, Cat. # I-5500), IBMX 115 µg / ml (Sigma, Cat. # I5879) y 0,0975 g / ml de dexametasona (Sigma, Cat. # D1756) durante 3 días, después de lo cual el medio de diferenciación fue reemplazado con DMEM completo. Una placa de adipocitos diferenciados 3T3-L1 se sembraron en cuatro placas de 96 pozos el día después de la sustitución medio.

[000259] Los adipocitos se trataron luego con FGF21-WT y la variante de la proteína FGF21 (véase la Tabla 2 para una lista de las variantes; 30 pM a 100 nM es el intervalo típico de concentraciones) durante toda la noche en medio de cultivo completo. Los adipocitos tratados con las muestras de FGF21 se privaron de suero en 50 µl de tampón KRH por pozo (0.75% de NaCl; 0.038% de KCl; 0.0196% de CaCl₂; 0.032% MgSO₄; 0.025 M de HEPES, pH 7.5; 0.5% de BSA; piruvato de sodio 2 mM) durante 2 horas. A los pozos de ensayo blanco se les añadieron 1 µL (concentración final de 5 mg / ml) de citocalasina B durante 15 min. El [3H]-2-DOG (20,6 mCi / mmol, 1 mCi / mL) se diluyó en proporción de 1:20 en 2-DOG 5,1 mM frío y 1 µL de 2-DOG diluido fue añadido a cada pozo y las células se incubaron durante 5 min. Las células se lavaron con tampón de KRH 100 µL / pozo por triplicado. Se añadió a las células 40 µL / pozo de SDS al 1% y se agitaron durante al menos 10 minutos. Se añadieron 200 µL / pozo de fluido de centelleo y las placas se agitaron durante toda la noche y se leyeron en el lector de microplaca beta. Los valores obtenidos a partir de una columna / fila enteras, que fueron tratados con citocalasina B, se promediaron y se restaron de todos los otros valores. Los datos se analizaron mediante el software GraphPad Prism, los resultados de los cuales se resumen en la Tabla 2 Las variantes de fusión V101, V103 y V188 de Fc-FGF21 F son superiores a la variante PEGilada V76 de FGF21 en la inducción de la captación de la 2-desoxiglucosa por los adipocitos 3T3L1 de ratón.

Ejemplo 3: Ensayo Western pERK dentro de la célula (ICW)

[000260] Las células HEK293 transfectadas de forma estable con β-klotho humana se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa, 10% de FBS, 1% de PS y 600 ng / ml de G418 en placas de 96 pozos recubiertos con poli-D-lisina (BD bioscience, Cat. # 356640) con una concentración de 30.000 células por pozo durante toda la noche. Las células fueron provadas de suero en DMEM alto en glucosa, 0,5% de BSA y HEPES 10 mM durante 4 horas. Las variantes WT FGF21 y FGF21 (véase la Tabla 3 para la lista

de variantes) se diluyeron a varias concentraciones (100 pM a 300 nM que es el rango de concentración típica usada) en el medio de cultivo de iniciación. Las células se estimularon con FGF21 durante 10 minutos. Después de la estimulación de la proteína FGF21 o la variante de FGF21, se aspiró el medio de los pozos y las células se lavaron una vez con 100 µL de PBS frío y luego se fijaron con 100 µL de formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y seguido por una incubación adicional de 10 minutos con 100 µL de metanol enfriado con hielo.

[000261] Después de la fijación, las células se lavaron con 0,3% de Triton X-100 en PBS cuatro veces, 5 minutos cada una. Se añadieron 150 µl tampón de bloqueo Odyssey a las células permeabilizadas a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se diluyó el anticuerpo Fosfo-ERK (pERK) a una concentración de 0,17 g / ml (dilución 1:200, o a las diluciones indicadas), y el anticuerpo total de ERK (TERK) se diluyó a una concentración de 2,2 mg / ml (1: 200 dilución o a las diluciones indicadas) en tampón de bloqueo Odyssey. Se añadieron 50 µl se añadió a cada pozo, omitiendo una columna que sólo fue tratada con el anticuerpo secundario para normalizar el fondo. La placa se cubrió con la torre de papel húmeda y la tapa para evitar la evaporación y después se incubó a 4 °C durante la noche.

[000262] Posteriormente, se aspiró el anticuerpo primario y las células se lavaron cuatro veces con 0,3% de Tween 20 en PBS durante 5 minutos cada una. Durante el lavado, se preparó la mezcla de la reacción anticuerpo secundario en tampón de bloqueo Odyssey que contiene al anticuerpo de cabra anti-ratón Alexa 680 diluido 1:1000 (o a las diluciones indicadas) y al anticuerpo IRDye800 de cabra anti-conejo diluido 1:1000 (o las diluciones indicadas). Una vez que se completó el lavado, se añadieron 40 µl de la mezcla de reacción a cada pozo. Las placas se cubrieron con la tapa negra para proteger el anticuerpo secundario de la luz, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador. Finalmente, las células se lavaron de nuevo cuatro veces con 0,3% de Tween 20 en PBS durante 5 minutos cada una, y luego fueron escaneadas en el Sistema Bioscience Odyssey LI-COR Infrared Imaging (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) en los canales de 700 nm (rojo) y 800 nm (verde). Alexa 680 teñía el tERK con una fluorescencia roja lejana (longitud de onda de emisión de 668 nm), mientras que el IRDye800 teñía el pERK con fluorescencia verde (longitud de onda de emisión de 800 nm). Para eliminar el fondo fluorescente, los valores obtenidos a partir de una columna entera / fila, que se trató sólo con anticuerpo secundario, se promedian y se restan de

- todos los demás valores obtenidos de la placa. Para la normalización de la cantidad de Perk presente en cada muestra, se dividieron los valores de pERK en cada pozo por los valores de tERK. Los datos se analizaron mediante el software GraphPad Prism, los resultados de los cuales se resumen en la Tabla 2. Las variantes de la fusión Fc-FGF21 V101, V103 y V188 son superiores a la Variante V76 pegilada de FGF21 en este ensayo de fosforilación de ERK.

Tabla 2: Resumen de resultados de ERK en una prueba de western celular y del ensayo de captación de glucosa en adipocito de ratón 3T3L1.

ID de la Variante de FGF21	pERK (HEK293/human $\square$- Klotho) CE50 $\pm$ SEM	La captación de glucosa (adipocitos de ratón 3T3L1) CE50 $\pm$ SEM
V76	13 $\pm$ 4 nM (n = 5)	5 $\pm$ 1 nM (n = 3)
V101	0,60 $\pm$ 0,06 nM (n = 5)	0,60 $\pm$ 0,06 nM (n = 3)
V103	0,9 $\pm$ 0,3 nM (n = 5)	0,60 $\pm$ 0,07 nM (n = 3)
V188	0,4 $\pm$ 0,1 nM (n = 3)	0,48 $\pm$ 0,14 nM (n = 3)

Ejemplo 4: Pruebas *in vivo* de las Variantes FGF21

- 10 **[000263]** El ratón ob / ob es un modelo de ratón para la diabetes tipo 2. Los ratones carecen de leptina funcional y se caracterizan por hiperglucemia, resistencia a la insulina, hiperfagia, esteatosis hepática y la obesidad. Se utilizaron ratones ob / ob machos (10-13 semanas de edad) para medir el efecto sobre la glucosa en sangre de la siguiente variante V76 PEGilada FGF21 y variantes de fusión Fc-FGF21 V101, V103 y V188.
- 15 **[000264]** Se les administró variantes FGF21 o vehículo de PBS s.c. a 1 mg / kg (V101, V103 y V188) o s.c. a 5 mg / kg de V76 dos veces por semana de 12 días (4 dosis en total). En el primer día del estudio, se midieron la cola de glucosa en sangre y el peso corporal y los ratones se asignaron a diferentes grupos (n = 8 por grupo) con media de glucosa y el peso corporal entre los grupos emparejados. La glucosa en sangre se midió
- 20 usando un glucómetro (OneTouch). La insulina en plasma se midió en el día 1 antes de la dosificación y en el día 12, 24 horas después de la última dosis. Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 5.
- [000265]** Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 3 y en las Figuras 1-3. Fc-Las variantes de la Fusión FGF21 V101, V103 y V188 son superiores a la

Variante V76 pegilada de FGF21 en cada punto final medido en estos estudios y en una dosis cinco veces inferior.

- Tabla 3.** % de cambios frente al vehículo en glucosa plasmática, insulina, ganancia del peso corporal (PC), hígado TG / lípidos por variantes FGF21 en estudios de 12 días en ratones ob / ob.

Resumen del estudio de tratamiento de 12 días en los ratones ob / ob diabéticos (% de cambio del vehículo)					
ID de la Variante de FGF21	Dosis (mg / kg)	Glucosa total (AUC)	Insulina en plasma	Peso Corporal	Lípidos del hígado
V76	5.0	-42%	-46%	-7%	-30%
V101	1.0	-53%	-82%	-12%	-44%
V103	1.0	-46%	-69%	-12%	-50%
V188	1.0	-42%	-59%	-11%	-51%

Ejemplo 5: Farmacocinética de las variantes de fusión de FGF21 en Ratones

- [000266]** Para determinar el perfil farmacocinético de las variantes de fusión de FGF21 V101, V103 y V188, los ratones C57BL/6J fueron inyectados IV con 1 mg del artículo de ensayo / kg y se sangraron en diversos puntos de tiempo a los 16 días (384 horas). Las muestras de sangre se recogieron en tubos de microvaloración recubiertos con EDTA, ya sea del plexo submandibular o retro-orbital. Aproximadamente se recogieron 50 µL de sangre en cada punto de tiempo, obteniendo ~ 25 µL de plasma.
- [000267]** Para medir las concentraciones plasmáticas de los artículos de prueba mediante ELISA, se recubrieron las placas de 384 pozos durante la noche a temperatura ambiente (RT) con 2 µg / ml de anticuerpo policlonal de cabra anti- Fc-gamma humano (30µL / pozo) y después se bloquearon con un diluyente a base de caseína durante 2 horas a TA (100 µL / pozo). Las muestras diluidas, los patrones y los controles se añadieron a la placa (30 µL / pozo) y se incubaron durante 2 horas a TA. Después se extrajeron las muestras, los pozos se lavaron 3 veces con una solución de lavado a base de fosfato (100 µL / pozo). Se añadió el anticuerpo de detección, una versión marcada con HRP del anticuerpo de captura, a la placa y se incubó durante 1 hora a TA (30 µL / pozo). Después la placa se lavó de nuevo 3 veces con una solución de lavado a base de

fosfato (100 µl/ pozo), se añadió un sustrato quimioluminiscente (30 µL / pozo) y la placa de la luminiscencia se leyó dentro de 5 minutos utilizando un lector de placas adecuado. Como se muestra en las Figuras 4A y 4B las variantes de fusión Fc-FGF21 tenían una vida plasmática muy extendida en relación con las fusiones Fc-FGF21 conocidas en la técnica (Figura 4A) y en relación con la variante V76 PEGilada de FGF21 (Figura 4B).

[000268] Los niveles séricos de artículos de prueba Fc-FGF21 fueron validados mediante Western blot para la comparación con los niveles medidos mediante ELISA para asegurarse de que la longitud completa de la variante de Fc-FGF21 y no la Fc sola estaba siendo detectada en el ELISA. Se combinaron dos uL de suero de ratón con 2,5 ul de tampón de carga 4X, 1 ul de desnaturalizante 10 veces y 4 ul de dH₂O, se calentó a 95°C durante 5 minutos y se cargó en un gel de gradiente de poliacrilamida al 4-12% y se sometieron a electroforesis durante 1 hora a 100 voltios (voltaje constante). Las muestras se transfirieron a papel de filtro de nitrocelulosa mediante Western blot utilizando el sistema iblot (Invitrogen, cat. # IB1001, tiempo de ejecución de 7 minutos). Los filtros de nitrocelulosa se bloquearon con 30 ml de solución de bloqueo de Rockland (Cat. # MB-070), se probaron siguiendo el protocolo del sistema iblot de captura con un anticuerpo de cabra anti- anticuerpo primario FGF21 a una dilución de 1:2000 (R&D systems, Cat. # BAF2539) y la estreptavidina con una etiqueta fluorescente como secundaria a una dilución de 1:10000 (Licor, cat. # 926-68031). Los niveles de proteína fueron registrados en el sistema Odyssey Licor a 700 nm y se comparó con 2 nM de control de V101 que se ejecutan en el mismo gel. Como se muestra en la Figura 4C las variantes de longitud completa Fc-FGF21 V101, V103 y V188 son detectables utilizando en una transferencia de Western usando un anticuerpo anti-FGF21 a 15 días a partir del suero de ratón a partir del estudio farmacocinético.

Ejemplo 6: Fc-FGF21 Fusión variantes V101, V103 y V188 son extremadamente termodinámicamente estable

[000269] Las proteínas pueden ser desplegadas en un rango específico de temperatura. La temperatura de despliegue de la proteína es un parámetro intrínseco para describir la estabilidad térmica de las proteínas. Se utiliza una calorimetría diferencial de barrido (DSC) para detectar la temperatura de despliegue de la proteína. Esta temperatura característica se describe como la temperatura de fusión (T_m), que es la temperatura pico durante el despliegue de la proteína.

- [000270] Las muestras de proteína original se diluyen en PBS a una concentración de ~ 1mg/ml (0.5mg/ml a 1,2 mg / ml) para un volumen total de 0,5 ml. Se añade una alícuota de 0,4 ml por pozo de muestra de proteína diluida, patrón, PBS, y agua DI a una placa DSC de 96 pozos. La placa se cubre entonces con un sello. Las muestras fueron
- 5 analizadas en un pozo calorímetro diferencial de barrido de 96 MicroCal. La temperatura se escaneó desde 10 hasta 110 grados C a una velocidad de 1 grado por minuto.
- [000271] Como se muestra en la Figura 4 D las temperaturas de fusión de las variantes de FGF21 V101, V103 y V188 son extremadamente altas. Esto contrasta con las temperaturas de fusión más bajas de la variante V76 de FGF21 y FGF21 de tipo silvestre
- 10 (no mostrado). Atribuimos la estabilidad mejorada de V101, V103 y V188 a la adición específica de un segundo puente disulfuro de las mutaciones novedosas Q55C y G148C. Este tipo de estabilidad termodinámica se conoce como una protección de proteínas frente a la proteólisis y, además, se puede traducir en una estabilidad prolongada significativamente in vivo y los perfiles farmacocinéticos mejorados ejemplificados por
- 15 los datos de las Figuras 4B y 4C.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende una variante FGF21 y una región Fc.
 2. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la secuencia de dicha proteína se selecciona a partir de una secuencia listada en la Tabla 1.
- 5

RESUMEN

La invención se refiere a la identificación de proteínas de fusión que comprenden variantes polipeptídicos y proteicos del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) que tienen propiedades farmacéuticas mejoradas. También se describen métodos para el tratamiento de trastornos asociados con el FGF21, incluyendo trastornos metabólicos.

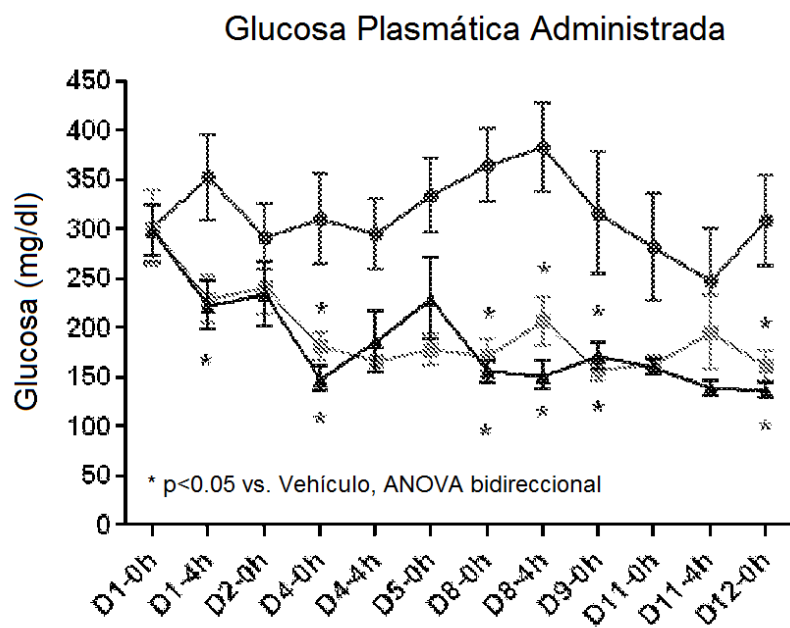


FIG 1A

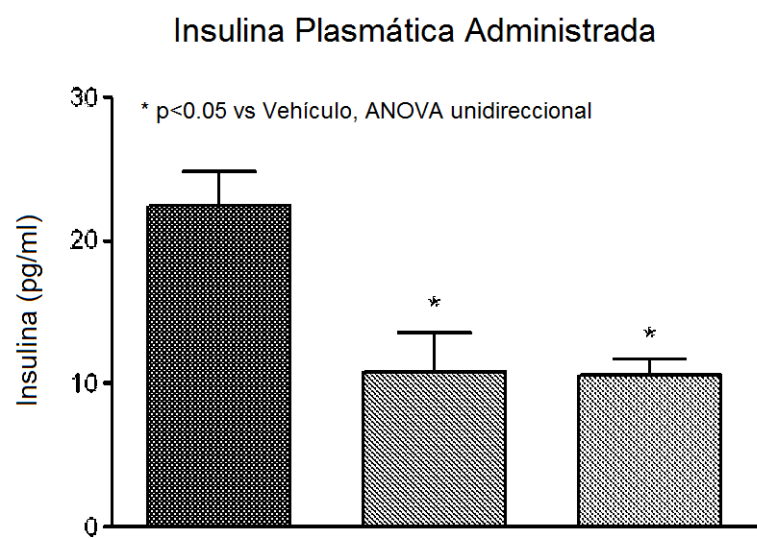


FIG 1B

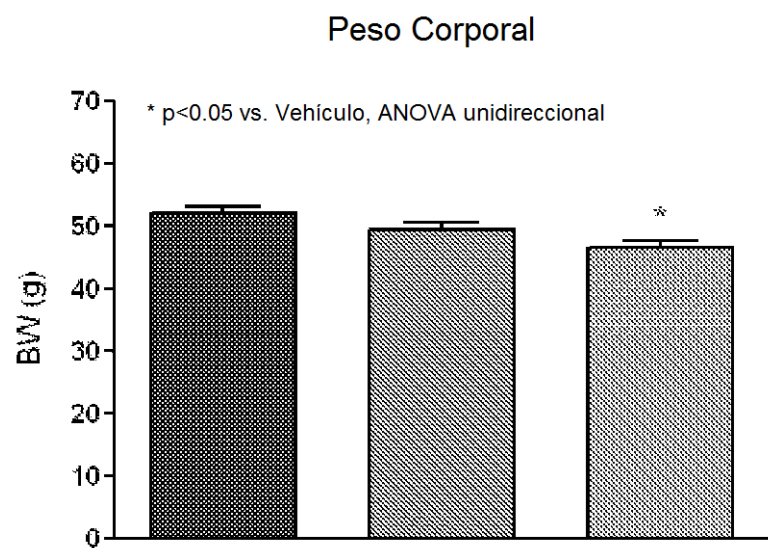


FIG 1C

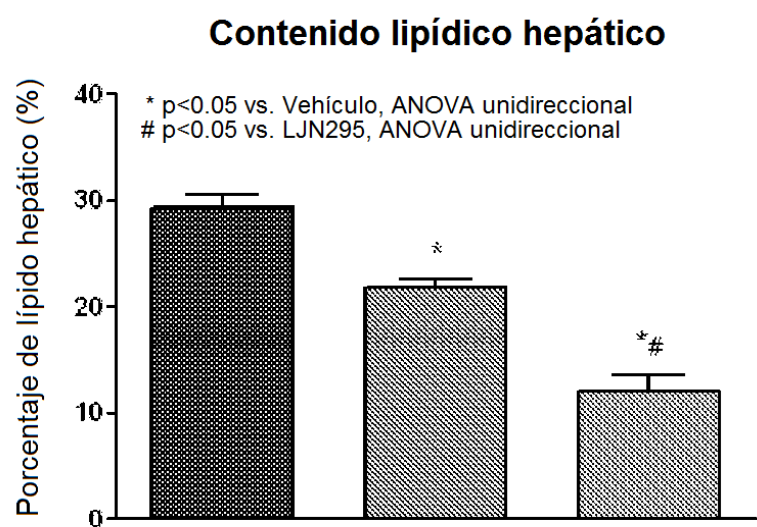


FIG 1D

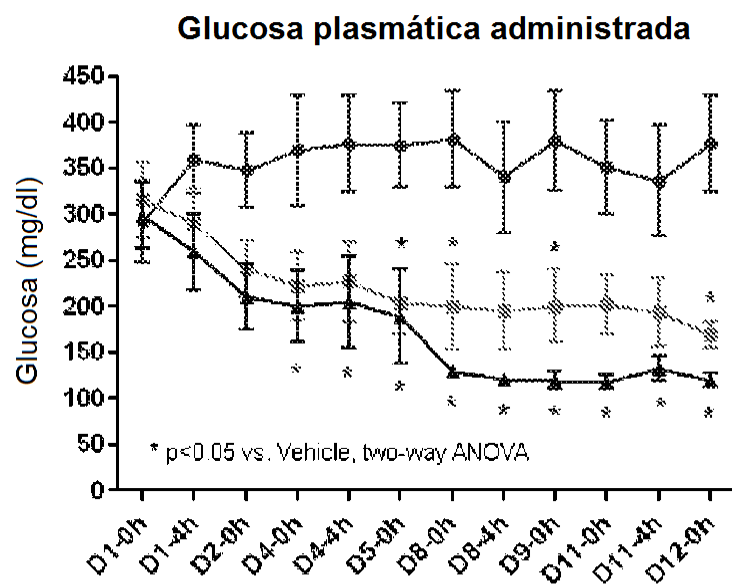


FIG 2A

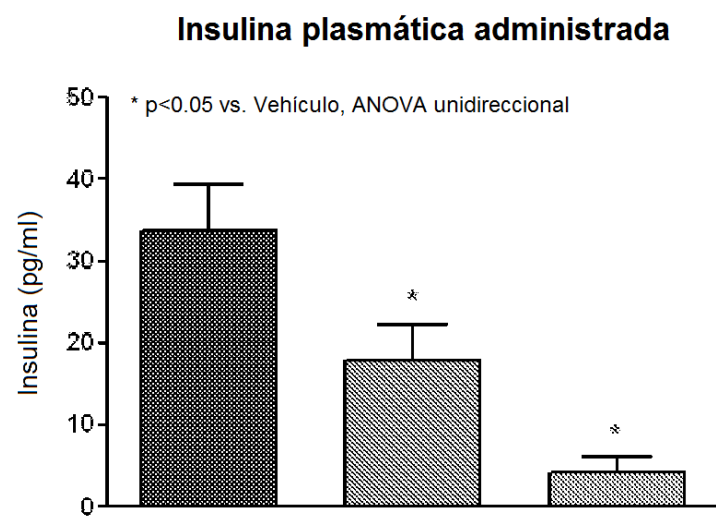


FIG 2B

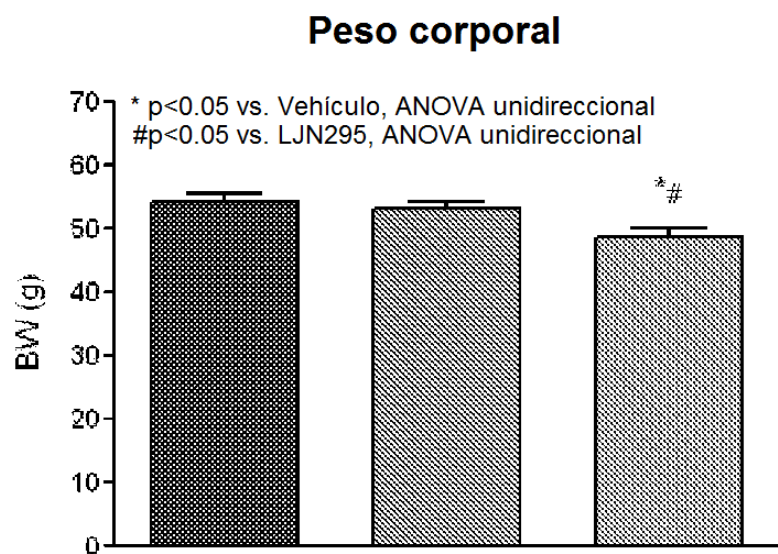


FIG 2C

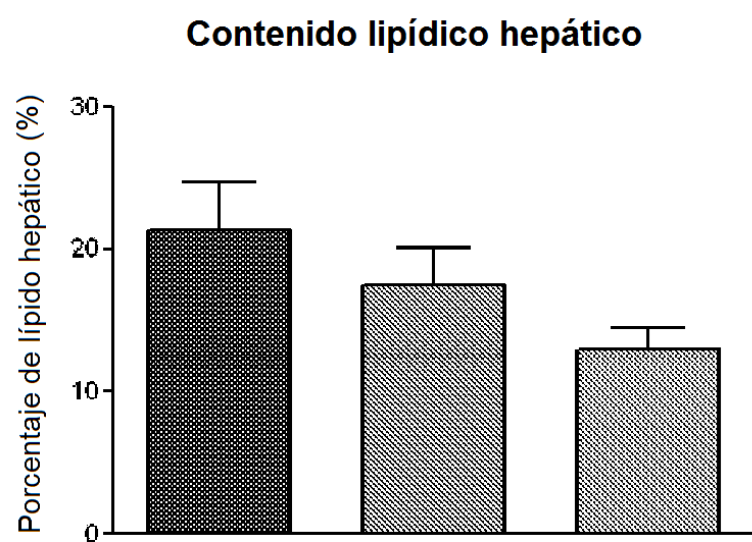


FIG 2D

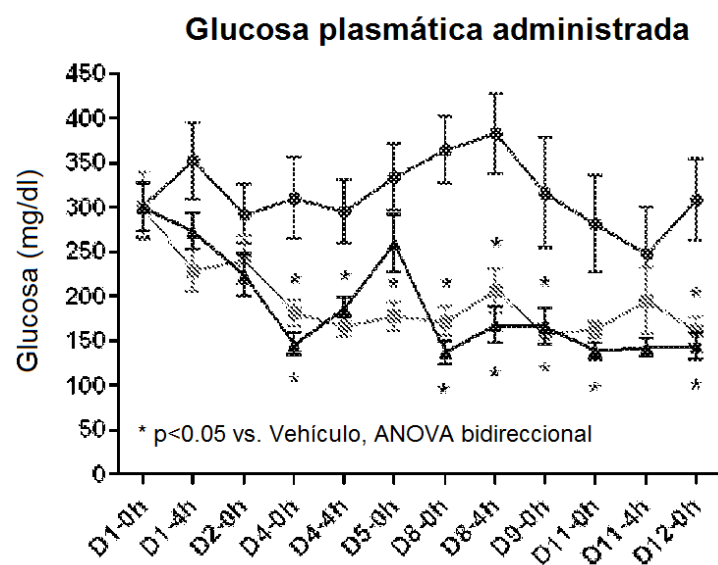


FIG 3A

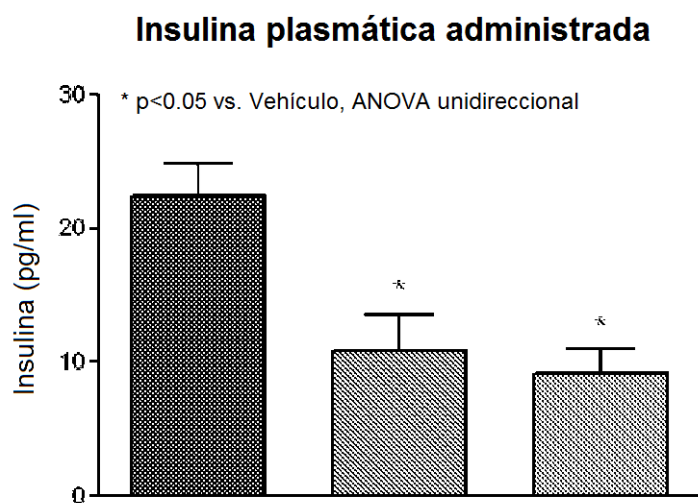


FIG 3B

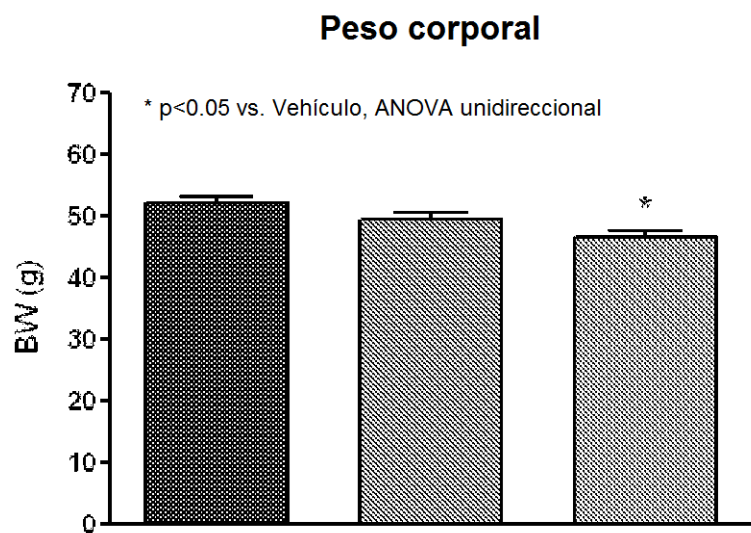


FIG 3C

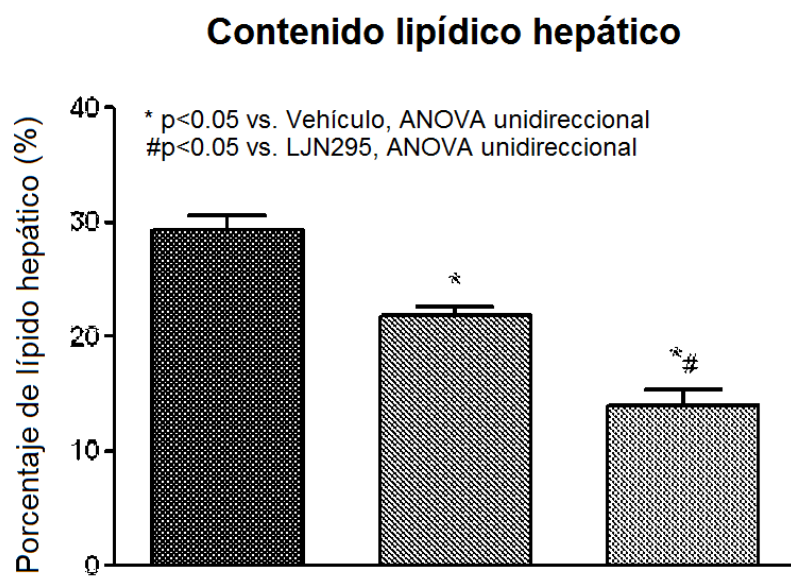


FIG 3D

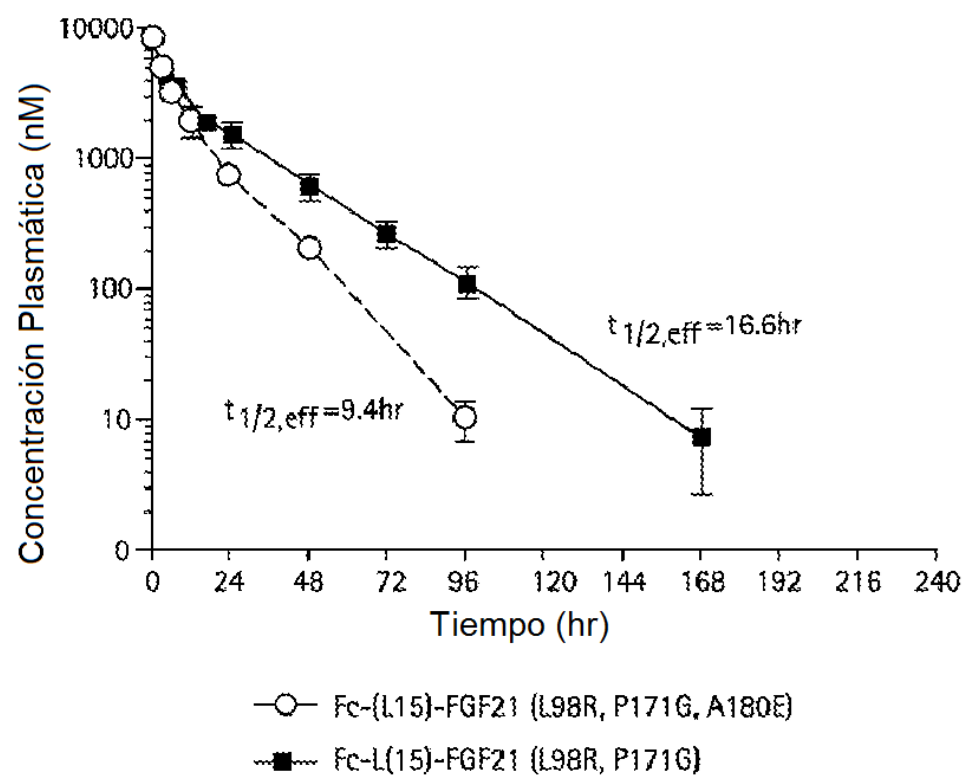


FIG 4A

1 mg/kg PK IV de ratón de dosis única

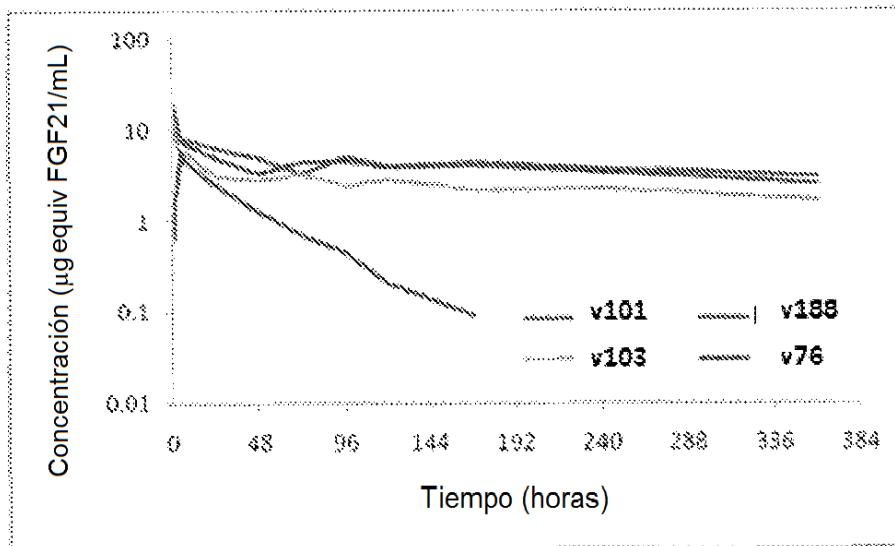


FIG 4B

Animal 3
120 horas I.V. Animal 3 Animal 6
15 días I.V. 15 días S.C.

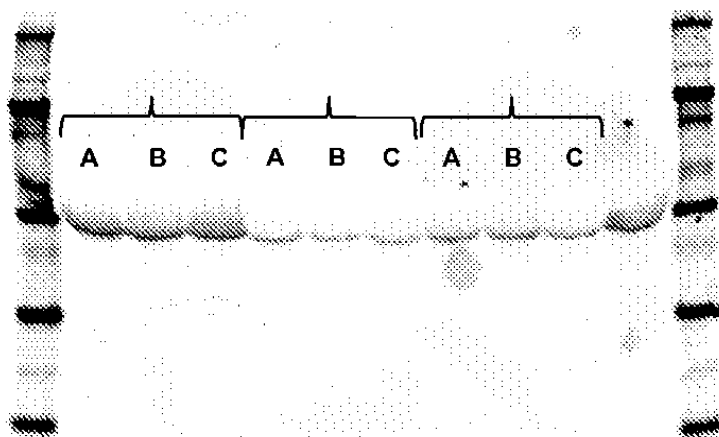


FIG 4C

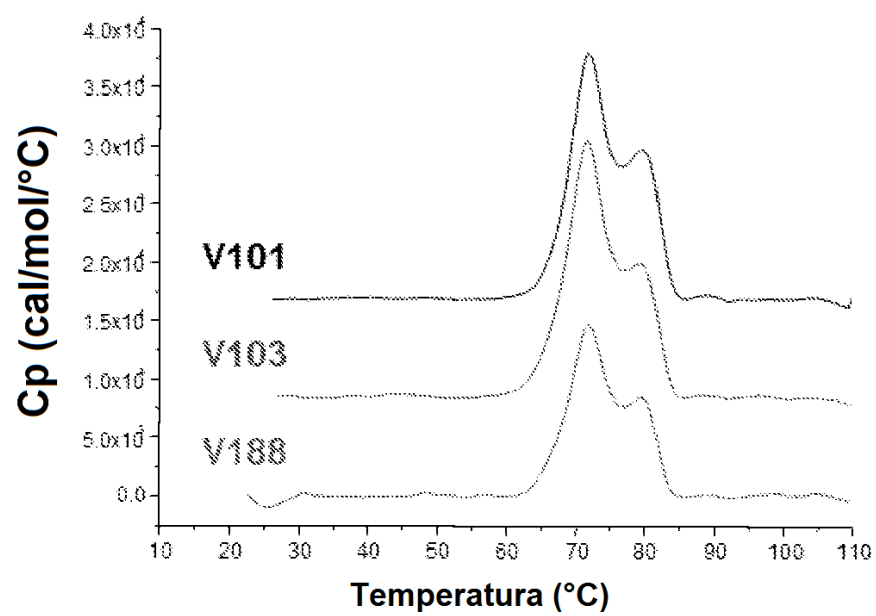


FIG4D

140325 Spanish translation Sequence listing Novartis 54783

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Boettcher, Brian
Daniels, Doug
Caplan, Shari
Hamamatsu, Norio
Weldon, Stephen
Licht, Stuart

<120> PROTEINAS DE FUSIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS METABÓLICOS

<130> PAT054783

<150> 61/539280

<151> 2011-09-26

<160> 13

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

<210> 1

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
 1      5      10
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
 20      25
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
 35      40      45
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 Leu Pro Glu
165      170      175
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln 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> 2

<211> 940

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

140325 Spanish translation Sequence listing Novartis 54783

```

ctgtcagctg aggatccagc cgaaaagagga gccaggcact caggccacct gagtctactc 60
acctggacaa ctggaatctg gcaccaattc taaaccactc agcttctccg agctcacacc 120
ccggagatca cctgaggacc cgagccattg atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac 180
tcaggactgt ggggtttctgt gctggctggg cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc 240
atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac 300
acagatgatg cccagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg 360
ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt 420
attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg ttcctgtgcc agcggccaga tggggccctg 480
tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac 540
ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac ggccctccgc tgcacctgcc agggaacaag 600
tccccacacc gggaccctgc accccgagga ccagctcgct tcctgccact accaggcctg 660
ccccccgcac tcccggagcc acccggaatc ctggccccc agccccccga tgtgggctcc 720
tcggaccctc tgagcatggg gggaccttcc cagggccgaa gccccagcta cgcttcctga 780
agccagaggc tgtttactat gacatctcct ctttatttat taggttattt atcttattta 840
tttttttatt tttcttactt gagataataa agagttccag aggagaaaaa aaaaaaaaaa 900
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 940

```

<210> 3
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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	Leu	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> 4
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4

caccccatcc	ctgactccag	tcctctcctg	caattcgggg	gccaaagtccg	gcagcgggtac	60
ctctacacag	atgatgccca	gcagacagaa	gcccacctgg	agatcagggga	ggatggggacg	120
gtggggggcg	ctgctgacca	gagccccgaa	agtctcctgc	agctgaaagc	cttgaagccg	180
ggagttattc	aaatcttggg	agtcaagaca	tccagggtcc	tgtgccagcg	gccagatggg	240
gccctgtatg	gatcgctcca	ctttgaccct	gaggcctgca	gcttccggga	gctgcttctt	300
gaggacggat	acaatgttta	ccagtccgaa	gcccacggcc	tcccgtgca	cctgccaggg	360
aacaagtccc	cacaccggga	ccctgcaccc	cgaggaccag	ctcgcttcct	gccactacca	420
ggcctgcccc	ccgcactccc	ggagccaccc	ggaatcctgg	ccccccagcc	ccccgatgtg	480

140325 Spanish translation Sequence listing Novartis 54783
 ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct 540
 tcctga 546

<210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 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
 20 25

<210> 6
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 ggggs ggggs ggggs

15

<210> 7
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys Gly Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 225 230 235 240
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 245 250 255
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 260 265 270

140325 Spanish translation Sequence listing Novartis 54783

Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
		275					280					285			
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp
	290					295					300				
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe
305					310					315					320
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala
				325					330					335	
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp
			340					345					350		
Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro
		355					360					365			
Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp
	370					375					380				
Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg
385					390					395					400
Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser										
				405											

<210> 8
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1				5					10					15	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20					25					30		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		35					40					45			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	50					55				60					
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70				75					80	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150				155						160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
			165					170						175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
		180						185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	210					215					220				
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
225					230					235					240
Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln
			245						250					255	
Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu
		260					265						270		
Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	
	275					280					285				
Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu

140325 Spanish translation Sequence listing Novartis 54783

290
 Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu
 305
 Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu
 310
 Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu
 325
 Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro
 340
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu
 355
 Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 370
 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
 385
 Tyr Ala Ser

<210> 9
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
 1
 Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Glu Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
 20
 Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala His Gln Ser Pro Glu Ser Leu
 35
 Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
 50
 Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Lys Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
 65
 Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
 85
 Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
 100
 His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Cys Asp Pro Ala Pro Gln Gly
 115
 Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
 130
 Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
 145
 Pro Leu Ala Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 165
 Ser

<210> 10
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35
 40

140325 Spanish translation Sequence listing Novartis 54783

Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
50						55				60					
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
			85						90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
			165						170					175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
	210					215					220				
Pro	Gly	Lys	Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln
225					230					235					240
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Gln	Thr	Glu	Ala
			245						250					255	
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln
			260					265					270		
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile
		275					280					285			
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp
	290					295					300				
Gly	Thr	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe
305					310					315					320
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala
			325						330					335	
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Asp
			340					345					350		
Pro	Ala	Ser	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro
		355					360					365			
Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp
	370					375					380				
Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Arg
385					390					395					400
Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser										
				405											

<210> 11
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

140325 Spanish translation Sequence listing Novartis 54783

65	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	80
				85						90					95		
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
				100					105					110			
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			115					120					125				
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		130					135					140					
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
145						150					155					160	
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				165						170					175		
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
			180						185					190			
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
			195					200					205				
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
		210				215						220					
	Pro	Gly	Lys	Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	
225						230					235					240	
	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Gln	Thr	Glu	Ala	
				245						250					255		
	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	
			260					265					270				
	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	
			275					280					285				
	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Lys	Pro	Asp	
		290				295						300					
	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	
305						310				315						320	
	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	
				325						330					335		
	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Asp	
			340						345					350			
	Pro	Ala	Ser	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	
			355					360					365				
	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	
		370				375						380					
	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Arg	
385						390					395					400	
	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser											
					405												

<210> 12
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

140325 Spanish translation Sequence listing Novartis 54783

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240
Gly Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
245 250 255
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Cys Gln Thr Glu Ala His Leu Glu
260 265 270
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu
275 280 285
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu
290 295 300
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Lys Pro Asp Gly Ala Leu
305 310 315 320
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu
325 330 335
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu
340 345 350
Pro Leu His Leu Pro Cys Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Ser
355 360 365
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu
370 375 380
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
385 390 395 400
Ser Asp Pro Leu Ala Met Val Gly Gly Ser Gln Ala Arg Ser Pro Ser
405 410 415
Tyr Ala Ser

<210> 13
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100

Tyr Ala Ser

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 54783 - WO - PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2012/057384	International filing date (<i>day/month/year</i>) 26/09/2012	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 26/09/2011
Applicant NOVARTIS AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/057384

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☐

 on paper
 - ☒

 in electronic form
 - b. (time)

☒

 in the international application as filed
 - ☐

 together with the international application in electronic form
 - ☐

 subsequently to this Authority for the purpose of search
2.

☐

 In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/057384

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see additional sheet(s)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/057384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48 C07K14/50
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/129503 A1 (AMGEN INC [US]; BELOUSKI EDWARD JOHN [US]; ELLISON MURIELLE MARIE [US]) 11 November 2010 (2010-11-11) claims 1-67 examples 1-28 pages 32-34 sequence 107	1,2
X	WO 2010/129600 A2 (AMGEN INC [US]; BELOUSKI EDWARD JOHN [US]; ELLISON MURIELLE MARIE [US]) 11 November 2010 (2010-11-11) claims 1-31 pages 51-52 examples 1-28 sequence 107 ----- -/-	1,2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 December 2012

Date of mailing of the international search report

11/03/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Behrens, Joyce

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/057384

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/078463 A2 (LILLY CO ELI [US]; ETGEN GARRETT JAY JUNIOR [US]; KHARITONENKOV ALEXEI) 27 July 2006 (2006-07-27) sequence 1 claims 1-10 -----	1,2
A	KHARITONENKOV A ET AL: "FGF-21 as a novel metabolic regulator", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 115, no. 6, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 1627-1635, XP002362553, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI23606 abstract page 1629, column 1, lines 20-24 -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/057384

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010129503	A1	11-11-2010	AR 076541 A1 22-06-2011
		AU 2010246108 A1 24-11-2011	
		CA 2760196 A1 11-11-2010	
		CN 102655877 A 05-09-2012	
		CO 6470863 A2 29-06-2012	
		EA 201171220 A1 30-05-2012	
		EP 2427208 A1 14-03-2012	
		JP 2012525844 A 25-10-2012	
		KR 20120068764 A 27-06-2012	
		MA 33716 B1 01-11-2012	
		PE 03582012 A1 26-04-2012	
		SG 175861 A1 29-12-2011	
		TW 201105345 A 16-02-2011	
		US 2010285131 A1 11-11-2010	
		US 2012177646 A1 12-07-2012	
		US 2012178685 A1 12-07-2012	
		US 2012213779 A1 23-08-2012	
		UY 32607 A 31-12-2010	
		WO 2010129503 A1 11-11-2010	
WO 2010129600	A2	11-11-2010	AU 2010246038 A1 01-12-2011
		CA 2760674 A1 11-11-2010	
		EP 2427207 A2 14-03-2012	
		JP 2012525847 A 25-10-2012	
		US 2012052069 A1 01-03-2012	
		WO 2010129600 A2 11-11-2010	
WO 2006078463	A2	27-07-2006	EP 1846019 A2 24-10-2007
		JP 2008528487 A 31-07-2008	
		US 2008261875 A1 23-10-2008	
		WO 2006078463 A2 27-07-2006	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 7.

2. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 8.

3. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 9.

4. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 10.

5. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 11.

6. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 12.

7. claims: 1, 2(partially)

A fusion protein corresponding to SEQ ID NO: 13.
