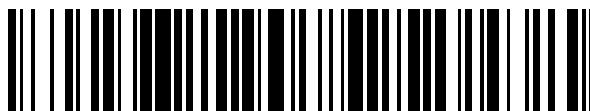


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 114**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/18 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08732507 .2**
96 Fecha de presentación: **19.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2068909**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **Polipéptidos de FGF-21 modificados y sus usos**

30 Prioridad:
30.03.2007 US 921297 P
14.11.2007 US 988060 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.07.2012

73 Titular/es:
AMBRX, INC.
10975 NORTH TORREY PINES ROAD, SUITE 100
LA JOLLA CA 92037, US

72 Inventor/es:
CUJEC, Thomas P.;
MARIANI, Roberto;
HAYS PUTNAM, Anna-maria A.;
KEEFE, William M.;
KNUDSEN, Nick;
HO, Lillian;
PINKSTAFF, Jason y
KRAYNOV, Vadim

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 385 114 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de FGF-21 modificados y sus usos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/921.297, presentada el 30 de marzo de 2007, y de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/988.060, presentada el 14 de noviembre de 2007.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos de FGF-21 opcionalmente modificados con al menos un aminoácido no codificado de forma natural.

Antecedentes de la invención

10 Los factores de crecimiento de fibroblastos son polipéptidos grandes expresados ampliamente en tejidos en desarrollo y adultos (Baird y col., *Cancer Cells*, 3: 239-243, 1991) y desempeñan papeles cruciales en múltiples funciones fisiológicas incluyendo angiogénesis, mitogénesis, formación de patrones, diferenciación celular, regulación metabólica y reparación de lesiones tisulares (McKeehan y col., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 59: 135-176, 1998; Burgess, W. H. y col., *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606 (1989)). Los factores de crecimiento de fibroblastos prototípicos (FGF), FGF-1 y FGF-2, se aislaron originalmente de cerebro e hipófisis como mitógenos para fibroblastos. Se identificó que FGF-3 era una diana común para activación por el virus de tumor mamario de ratón (Dickson y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 638: 18-26 (1991); FGF-4 a FGF-6 se identificaron como productos de oncogenes (Yoshida y col., *Ann. NY Acad. Sci.* 638: 27-37 (1991); Goldfarb y col., *Ann. NY Acad. Sci.* 638: 38-52 (1991); Coulier y col., *Ann. NY Acad. Sci.* 638: 53-61 (1991)). FGF-10 se identificó a partir de pulmón de rata por reacción en cadena de la polimerasa basada en homología (PCR) (Yamasaki y col., *J. Biol. Chem.* 271: 15918-15921 (1996)). FGF-11 a FGF-14 (factores homólogos de FGF (FHF) 1 a 4) se identificaron a partir de la retina humana por una combinación de secuenciación de ADNc aleatoria, búsquedas en bases de datos y PCR basada en homología (Smallwood y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9850-9857 (1996)). FGF-15 se identificó como una diana corriente abajo de una oncoproteína de homeodominio quimérica (McWhirter y col., *Development* 124: 3221-3232 (1997)). FGF-16, FGF-17, y FGF-18 se identificaron a partir de corazón de rata y embriones por PCR basada en homología, respectivamente (Miyake y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243: 148-152 (1998); Hoshikawa y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 187-191 (1998); Ohbayashi y col., *J. Biol. Chem.* 273:1 8161-18164 (1998)). FGF-19 se identificó a partir de cerebro fetal humano por búsqueda en una base de datos (Nishimura y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1444: 148-151 (1999)). Tienen un núcleo de ~120 restos de aminoácidos con ~30 a 60% de identidad de aminoácidos.

15 Los modelos animales, sobreexpresión y análisis de mutaciones de origen natural implican a factores de crecimiento de fibroblastos y sus receptores en una amplia serie de enfermedades (por ejemplo, Wilkie y col., *Current Biology*, (1995) 5: 500-507; Pugh-Humphreys y col., En: *The Cytokine Handbook*, A. Thomson ed, 2ª edición, Academic Press, Harcourt Brace & co. publishers, Londres, pág. 525-566), lo que sugiere que la regulación de la actividad podría usarse para tratamiento. Por ejemplo, la inhibición del factor de crecimiento de fibroblastos 2 por el compuesto Suramina evita la neovascularización y crecimiento tumoral en ratones (Pesenti y col., *British Journal of Cancer*, 66: 367-372). Los factores de crecimiento de fibroblastos también actúan en la angiogénesis (Lyons, M. K., y col., *Brain Res.* (1991) 558: 315-320), curación de heridas (Uhl, E., y col., *Br. J. Surg.* (1993) 80: 977-980, 1993), astrogliosis, proliferación y diferenciación de células gliales (Biagini, G. y col., *Neurochem. Int.* (1994) 25: 17-24), vasodilatación cerebral (Tanaka, R. y col., *Stroke* (1995) 26: 2154-2159) y procesos neurotróficos/neuromoduladores.

20 El factor de crecimiento de fibroblastos también tiene múltiples efectos positivos que incluyen el flujo sanguíneo y protección de toxicidad por calcio para mejorar el resultado en isquemia cerebral (Mattson, M. P. y col., *Semin. Neurosci.* (1993) 5: 295-307; Doetrocj. W. D. y col., *J. Neurotrauma* (1996) 13: 309-316). El tratamiento con FGF básico promueve la neoangiogénesis en miocardio isquémico (Schumacher y col., *Circulation* (1998) 97: 645-650). El FGF básico mejora la recuperación funcional y promueve el crecimiento neuronal después de un infarto cerebral focal (Kawamata y col., *Proc.Natl. Acad. Sci.* (1997) 94 (15): 8179-84). De acuerdo con la bibliografía publicada, la familia de FGF consiste en al menos veintidós miembros (Reuss y col., *Cell Tissue Res.* 313: 139-157 (2003)).

25 Se ha notificado que el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) se expresa preferentemente en el hígado (Nishimura y col., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1492: 203-206 (2000); documento WO 01/36640; y documento WO 01/18172) y se ha descrito como un tratamiento para enfermedad vascular isquémica, curación de heridas y enfermedades asociadas con pérdida de células o función pulmonares, bronquiales o alveolares y otros numerosos trastornos. FGF-21 se expresa principalmente en hígado, riñón y tejido muscular (véase el Ejemplo 2 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040259780). El gen de FGF-21 se compone de 3 exones y se localiza en el cromosoma 19. A diferencia de otros FGF, el FGF-21 no tiene efectos proliferativos y tumorigénicos (Genome Biol. 2001; 2(3): REVIEWS3005).

La Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20010012628 describe una secuencia de nucleótidos y proteica para FGF-21 humano (véase la SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente de la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20010012628). La SEC ID N°: 2 en la publicación anteriormente mencionada, denominada sbgFGF-19, es de 209 aminoácidos de longitud y contiene una secuencia líder de 28 aminoácidos en el extremo N terminal. La secuencia de FGF-21 humana presentada como SEC ID N°: 3 en el presente documento es la misma secuencia que la SEC ID N°: 2 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20010012628. Esta secuencia tiene un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con prolina (P) en la posición 174, denominado en lo sucesivo en el presente documento la "forma P de 209 aminoácidos de FGF-21".

La Patente de Estados Unidos N° 6.716.626 analiza FGF-21 humano y proteínas homólogas en otros mamíferos, particularmente ratones y ratas. El FGF de ratón mostrado como SEC ID N°: 1 de la Patente de Estados Unidos N° 6.716.626 se expresaba en gran medida en hígado y se expresaba en los testículos y el timo, y se sugirió que el FGF-21 humano puede desempeñar un papel en el desarrollo y recuperación de enfermedades hepáticas y/o trastornos de la función testicular o función de células derivadas del timo. La SEC ID N°: 4 de la Patente de Estados Unidos N° 6.716.626 es de 209 aminoácidos de longitud y contiene una secuencia líder de 28 aminoácidos en el extremo N terminal. La secuencia de FGF-21 humano presentada como SEC ID N°: 6 en el presente documento es la misma secuencia que la SEC ID N°: 4 de la Patente de Estados Unidos N° 6.716.626. Esta secuencia tiene un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con leucina (L) en la posición 174, denominada en lo sucesivo en el presente documento la "forma L de 209 aminoácidos de FGF-21".

La Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040259780 analiza el FGF-21 y presenta una secuencia de 208 aminoácidos de longitud (SEC ID N°: 2 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040259780) y contiene una secuencia líder de 27 aminoácidos en el extremo N terminal. La secuencia de FGF-21 humana presentada como SEC ID N°: 7 en el presente documento es la misma secuencia que la SEC ID N°: 2 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040259780. Esta secuencia tiene un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con leucina (L) en la posición 173, denominada en lo sucesivo en el presente documento la "forma L de 208 aminoácidos de FGF-21".

Se ha mostrado que el FGF-21 estimula la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 de ratón en presencia y ausencia de insulina, y reduce los niveles de glucosa, triglicéridos y glucagón en sangre, posprandiales y en ayunas, en ratones *ob/ob* y *db/db* y ratas ZDF de 8 semanas de edad de una manera dependiente de dosis, proporcionando de este modo la base para el uso de FGF-21 como una terapia para el tratamiento de la diabetes y obesidad (documento WO 03/011213 y Kharitononkov y col. J Clin Invest. Jun 2005; 115(6): 1627-35). Kharitononkov y col. J Clin Invest. Jun 2005; 115(6): 1627-35 también mostraron que los ratones transgénicos que expresan FGF-21 humano son hipoglucémicos, sensibles a la insulina y resistentes a la obesidad inducida por la dieta. Kharitononkov y col. Endocrinology (en prensa) también muestran que el FGF-21 reducía la glucosa, triglicéridos, insulina y glucagones en monos Rhesus diabéticos.

Además, se ha mostrado que el FGF-21 es eficaz en la reducción de la mortalidad y morbilidad de pacientes críticos (documento WO 03/059270). Se ha descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20050176631 que el FGF-21 afecta al estado metabólico global y puede contrarrestar los efectos secundarios negativos que pueden producirse durante la respuesta de tensión del cuerpo a septicemia así como en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) resultante de causas patológicas no infecciosas. Por lo tanto, el FGF-21 puede usarse para reducir la mortalidad y morbilidad que se produce en pacientes críticos. Los pacientes críticos incluyen los pacientes que son fisiológicamente inestables que requieren cuidados médicos, de enfermería y respiratorios coordinados continuos. Este tipo de cuidados requiere prestar particular atención a los detalles para proporcionar vigilancia y valoración constante de la terapia. Los pacientes críticos incluyen los pacientes que están en riesgo de descompensación fisiológica y por lo tanto requieren control constante de modo que el equipo de cuidados intensivos pueda proporcionar intervención inmediata para evitar acontecimientos adversos. Los pacientes críticos tienen necesidades especiales de control y soporte vital que deben proporcionarse por un equipo que pueda proporcionar cuidado valorado continuo.

En el documento WO 2005/091944 se describen polipéptidos de FGF-21 PEGilados. El polipéptido de FGF-21 descrito en el documento WO 2005/091944 es un polipéptido de 181 aminoácidos. La secuencia de FGF-21 humano madura, de tipo silvestre o nativa indicada como SEC ID N°: 1 del documento WO 2005/091944 carece de una secuencia líder. Este FGF-21 humano es altamente idéntico al FGF-21 de ratón (~79% de identidad de aminoácidos) y al FGF-21 de rata (~80% de identidad de aminoácidos). La secuencia de FGF-21 humano presentada como SEC ID N°: 5 en el presente documento es la misma secuencia que la SEC ID N°: 1 del documento WO 2005/091944. Esta secuencia tiene un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con leucina (L) en la posición 146. Un experto habitual en la materia podría usar fácilmente secuencias polipeptídicas de FGF-21 de mamífero alternativas o análogos, muteínas o derivados que tienen suficiente homología con las secuencias de FGF-21 humano para los usos descritos en el presente documento.

La secuencia de FGF-21 humano presentada como SEC ID N°: 1 en el presente documento tiene un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con prolina (P) en la posición 146. Una versión con marcador His N terminal de la SEC ID N°: 1 se muestra como SEC ID N°: 2 en el presente documento.

El documento WO 2005/091944 describe la unión covalente de una o más moléculas de PEG con restos particulares de un compuesto de FGF-21. El compuesto resultante era un compuesto de FGF-21 PEGilado biológicamente activo con una semivida de eliminación prolongada y aclaramiento reducido en comparación con el de FGF-21 nativo. Las moléculas de PEG se unieron covalentemente a restos de cisteína o lisina. Se realizaron sustituciones en diversas posiciones con cisteína para permitir la unión de al menos una molécula de PEG. Se describió la PEGilación en uno o más restos de lisina (56, 59, 69 y 122).

Los compuestos de FGF-21 PEGilado serían útiles en el tratamiento de sujetos con trastornos, incluyendo, pero sin limitación, diabetes de tipo 2, obesidad, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia y síndrome metabólico. Sería particularmente ventajoso tener compuestos de FGF-21 PEGilado que pudieran aumentar la eficacia posibilitando una mayor semivida en circulación y que requirieran menos dosis, aumentando tanto la conveniencia para un sujeto que necesitara dicha terapia como la probabilidad de la adherencia del sujeto a los requisitos de dosificación. El síndrome metabólico puede definirse como un grupo de al menos tres de las siguientes señales: grasa abdominal - en la mayoría de los hombres, una cintura de 101,6 cm o mayor; alto nivel de azúcar en sangre - al menos 110 miligramos por decilitro (mg/dl) después de ayuno; altos niveles de triglicéridos - al menos 150 mg/dl en el torrente sanguíneo; bajo nivel de HDL - menos de 40 mg/dl; y presión sanguínea de 130/85 o mayor.

La unión covalente del polímero hidrófilo poli(etilenglicol), abreviado PEG, es un procedimiento para aumentar la solubilidad en agua y la biodisponibilidad, aumentar la semivida en suero, aumentar la semivida terapéutica, modular la inmunogenicidad, modular la actividad biológica o prolongar el tiempo de circulación de muchas moléculas biológicamente activas, incluyendo proteínas, péptidos y particularmente moléculas hidrófobas. El PEG se ha usado extensivamente en compuestos farmacéuticos, en implantes artificiales y en otras aplicaciones en las que la biocompatibilidad, falta de toxicidad y falta de inmunogenicidad son importantes. Para maximizar las propiedades deseadas de PEG, el peso molecular total y estado de hidratación del polímero o polímeros de PEG unidos con la molécula biológicamente activa deben ser suficientemente altos para transmitir las características ventajosas típicamente asociadas con la unión con polímero PEG, tales como un aumento de la solubilidad en agua y la semivida en circulación, sin tener impacto negativo en la bioactividad de la molécula precursora.

Los derivados de PEG se unen frecuentemente a moléculas biológicamente activas a través de funcionalidades químicas reactivas, tales como restos de lisina, cisteína e histidina, el extremo N terminal y restos de carbohidratos. Ha habido investigación sobre la formulación de un compuesto de FGF-21 terapéutico, pero ha sido problemática por muchas razones, una de las cuales es que las proteínas y otras moléculas con frecuencia tienen un número limitado de sitios reactivos disponibles para la unión con polímeros. Con frecuencia, los sitios más adecuados para modificación mediante unión con polímeros desempeñan un papel significativo en la unión del receptor y son necesarios para la retención de la actividad biológica de la molécula. Como resultado, la unión indiscriminada de cadenas poliméricas con tales sitios reactivos en una molécula biológicamente activa con frecuencia conduce a una reducción significativa o incluso la pérdida total de actividad biológica de la molécula modificada con polímero. R. Clark y col., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271: 21969-21977. Para formar conjugados que tengan suficiente peso molecular del polímero para transmitir las ventajas deseadas a una molécula diana, los enfoques de la técnica anterior han implicado típicamente la unión aleatoria de numerosas ramas de polímeros con la molécula, aumentando de este modo el riesgo de una reducción o incluso pérdida total de la bioactividad de la molécula parental.

Los sitios reactivos que forman los loci para unión de derivados de PEG con proteínas se dictan por la estructura de la proteína. Las proteínas, incluyendo enzimas, están compuestas de diversas secuencias de aminoácidos alfa, que tienen la estructura general $H_2N-CHR-COOH$. El resto amino alfa (H_2N-) de un aminoácido se une con el resto carboxilo ($COOH$) de un aminoácido adyacente para formar enlaces amida, que pueden representarse como $-(NH-CHR-CO)_n-$, en la que el subíndice "n" puede equivaler a cientos o miles. El fragmento representado por R puede contener sitios reactivos para actividad biológica de proteínas y para unión de derivados de PEG.

Por ejemplo, en el caso del aminoácido lisina, existe un resto $-NH_2$ en la posición épsilon así como en la posición alfa. El $-NH_2$ épsilon está libre para la reacción en condiciones de pH básico. Gran parte de la técnica en el campo de la derivatización de proteínas con PEG se ha dirigido a desarrollar derivados de PEG para unión con el resto $-NH_2$ épsilon de restos de lisina presentes en proteínas. "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pág. 1-17. Todos estos derivados de PEG tienen la limitación común, sin embargo, de que no pueden instalarse de forma selectiva entre los restos de lisina con frecuencia numerosos presentes en las superficies de proteínas. Ésta puede ser una limitación significativa en casos en los que un resto de lisina es importante para la actividad proteica, al existir por ejemplo en un sitio activo de enzima, o en casos en los que un resto de lisina desempeña un papel en la mediación de la interacción de la proteína con otras moléculas biológicas, como es el caso de sitios de unión de receptores.

Una segunda complicación igualmente importante de los procedimientos existentes para la PEGilación de proteínas es que los derivados de PEG pueden experimentar reacciones secundarias no deseadas con restos distintos de los deseados. La histidina contiene un resto imino reactivo, representado estructuralmente como $-N(H)-$, pero muchas especies químicamente reactivas que reaccionan con $-NH_2$ épsilon pueden también reaccionar con $-N(H)-$. De forma similar, la cadena lateral del aminoácido cisteína porta un grupo sulfhidrilo libre, representado estructuralmente como $-SH$. En algunos casos, los derivados de PEG dirigidos al grupo $-NH_2$ épsilon de lisina

también reaccionan con cisteína, histidina u otros restos. Esto puede crear mezclas complejas heterogéneas de moléculas bioactivas derivatizadas con PEG y riesgos de destruir la actividad de la molécula bioactiva a la que se dirigen. Sería deseable desarrollar derivados de PEG que permitieran que un grupo funcional químico se introdujera en un solo sitio dentro de la proteína que permitiera después el acoplamiento selectivo de uno o más polímeros de PEG con la molécula bioactiva en sitios específicos en la superficie de la proteína que están bien definidos y son predecibles.

Además de los restos de lisina, se ha dirigido un considerable esfuerzo en la técnica al desarrollo de reactivos de PEG activados que se dirigen a otras cadenas laterales de aminoácidos, incluyendo cisteína, histidina y el extremo N terminal. Véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.610.281 y "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pág. 1-17. Puede introducirse un resto de cisteína con selectividad de sitio en la estructura de proteínas usando mutagénesis dirigida y otras técnicas conocidas en la materia, y puede hacerse reaccionar el resto sulfhidrilo libre resultante con derivados de PEG que portan grupos funcionales reactivos con tiol. Este enfoque es complicado, sin embargo, ya que la introducción de un grupo sulfhidrilo libre puede complicar la expresión, plegamiento y estabilidad de la proteína resultante. Por lo tanto, sería deseable tener un medio para introducir un grupo funcional químico en FGF-21 que permitiera el acoplamiento selectivo de uno o más polímeros de PEG con la proteína siendo al mismo tiempo compatible con (es decir, no tomando parte en reacciones secundarias no deseadas con) sulfhidrilos y otros grupos funcionales químicos encontrados típicamente en proteínas.

Como puede verse a partir de una toma de muestras de la técnica, muchos de estos derivados que se han desarrollado para unión con las cadenas laterales de proteínas, en particular, el resto $-NH_2$ en la cadena lateral del aminoácido lisina y el resto $-SH$ en la cadena lateral de cisteína, han demostrado ser problemáticos en su síntesis y uso. Algunos forman enlaces inestables con la proteína que se someten a hidrólisis y de este modo se descomponen, degradan o son de otro modo inestables en ambientes acuosos, tales como en el torrente sanguíneo. Algunos forman enlaces más estables, pero se someten a hidrólisis antes de que se forme el enlace, lo que significa que el grupo reactivo en el derivado de PEG puede inactivarse antes de que pueda unirse la proteína. Algunos son algo tóxicos y, por lo tanto, son menos adecuados para su uso *in vivo*. Algunos son demasiado lentos al reaccionar para ser útiles en la práctica. Algunos dan como resultado una pérdida de actividad proteica al unirse a sitios responsables de la actividad de la proteína. Algunos no son específicos para los sitios a los que se unirán, lo cual también pueden dar como resultado una pérdida de actividad deseable y una falta de reproducibilidad de los resultados. Para superar los desafíos asociados con la modificación de proteínas con restos de poli(etilenglicol), se han desarrollado derivados de PEG que son más estables (por ejemplo, Patente de Estados Unidos 6.602.498) o que reaccionan de forma selectiva con restos de tiol en moléculas y superficies (por ejemplo, Patente de Estados Unidos 6.610.281). Existe claramente una necesidad en la técnica de derivados de PEG que sean químicamente inertes en ambientes fisiológicos hasta que se les haga reaccionar de forma selectiva para formar enlaces químicos estables.

Recientemente, se ha presentado una tecnología completamente nueva en la ciencia de las proteínas, que promete superar muchas de las limitaciones asociadas con modificaciones específicas de sitio de proteínas. Específicamente, se han añadido nuevos componentes a la maquinaria biosintética de proteínas del procarionta *Escherichia coli* (*E. coli*) (por ejemplo, L. Wang, y col., (2001), Science 292: 498-500) y el eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (por ejemplo, J. Chin y col., Science 301: 964-7 (2003)), que han permitido la incorporación de aminoácidos no codificados genéticamente a proteínas *in vivo*. Se han incorporado varios aminoácidos con nuevas propiedades químicas, físicas o biológicas, incluyendo marcadores de fotoafinidad y aminoácidos fotoisomerizables, aminoácidos fotoreticuladores (véase, por ejemplo, Chin, J. W., y col. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99: 11020-11024; y, Chin, J. W., y col., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124: 9026-9027), ceto aminoácidos, aminoácidos que contienen átomos pesados y aminoácidos glicosilados, de forma eficaz y con alta fidelidad, en proteínas en *E. coli* y en levaduras en respuesta al codón ámbar, TAG, usando esta metodología. Véase, por ejemplo, J. W. Chin y col., (2002), Journal of the American Chemical Society 124: 9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 3(11): 1135-1137; J. W. Chin, y col., (2002), PNAS United States of America 99: 11020-11024; y, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1: 1-11. Estos estudios han demostrado que es posible introducir de forma selectiva y rutinaria grupos funcionales químicos, tales como grupos cetona, grupos alquino y restos azida, que no se encuentran en proteínas, que son químicamente inertes para todos los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente y que pueden usarse para reaccionar eficaz y selectivamente para formar enlaces covalentes estables.

La capacidad para incorporar aminoácidos no codificados genéticamente en proteínas permite la introducción de grupos funcionales químicos que podrían proporcionar alternativas valiosas a los grupos funcionales de origen natural, tales como el $-NH_2$ epsilon de lisina, el sulfhidrilo $-SH$ de cisteína, el grupo imino de histidina, etc. Se sabe que ciertos grupos funcionales químicos son inertes para los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos codificados genéticamente comunes, pero reaccionan de forma limpia y eficaz para formar enlaces estables. Se conoce en la técnica que los grupos azida y acetileno, por ejemplo, experimentan una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] en condiciones acuosas en presencia de una cantidad catalítica de cobre. Véase, por ejemplo, Tornøe, y col., (2002) J. Org. Chem. 67: 3057-3064; y Rostovtsev, y col., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596-2599. Introduciendo un resto azida en una estructura proteica, por ejemplo, se puede incorporar un grupo funcional que es químicamente inerte a aminas, sulfhidrilos, ácidos carboxílicos y grupos hidroxilo encontrados en proteínas,

pero que también reacciona de forma suave y eficaz con un resto acetileno para formar un producto de cicloadición. Es importante que, en ausencia del resto acetileno, la azida permanece químicamente inerte y no reacciona en presencia de otras cadenas laterales de proteínas y en condiciones fisiológicas.

5 Nishimura y col. (2000) BBA 1492, 203-206 y el documento WO01/36640 desvelan el descubrimiento de FGF-21. El documento WO01/1817 desvela modificación química, tal como pegilación de FGF-21. El documento WO2005/074546 desvela polipéptidos de hormona de crecimiento humana con propiedades mejoradas o modificadas. Los documentos WO2006/050247 y WO2005/091944 desvelan la modificación química de FGF-21 para mejorar las propiedades del mismo.

10 Los documentos US 2006/194256 y US 7.259.248 desvelan polipéptidos modificados que comprenden aminoácidos no naturales y procedimientos para prepararlos.

La presente invención aborda, entre otras cosas, problemas asociados con la actividad y producción de polipéptidos de FGF-21, y también aborda la producción de un polipéptido de FGF-21 con propiedades biológicas o farmacológicas mejoradas, tales como una semivida terapéutica mejorada.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona un polipéptido de FGF-21 que comprende una secuencia mostrada en la SEC ID N°: 1-7, excepto porque un aminoácido se ha sustituido por un aminoácido no codificado de forma natural en la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEC ID N°: 2-7), en el que un polímero soluble en agua se une al aminoácido no codificado de forma natural presente en dicho polipéptido de FGF-21.

20 En algunas realizaciones, el polipéptido de FGF-21 se une a un engarce, polímero o molécula biológicamente activa. En algunas realizaciones, el polipéptido de FGF-21 se une a un polímero bifuncional, engarce bifuncional o al menos a un polipéptido de FGF-21 adicional.

25 El aminoácido no codificado de forma natural se une a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural se une al polímero soluble en agua con un engarce o se une al polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero bifuncional. En algunas realizaciones, el polímero bifuncional se une a un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es un polipéptido de FGF-21.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido de FGF-21 comprende al menos dos aminoácidos unidos a un polímero soluble en agua que comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, al menos un aminoácido es un aminoácido no codificado de forma natural.

Un aminoácido de no codificado de forma natural se incorpora en la siguiente posición en FGF-21: (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En algunas realizaciones, se clonan construcciones de secreción de FGF-21 en pVK7ara (Nde/Eco) con secuencias líder seleccionadas de las SEC ID N°: 39, 40, 41, 42, 43 o 44.

35 En algunas realizaciones, el aminoácido de origen no natural en una de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua en la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7).

40 En algunas realizaciones de las divulgaciones, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o deleción que modula la afinidad del polipéptido de FGF-21 por un compañero de unión o receptor del polipéptido de FGF-21, incluyendo, pero sin limitación, una proteína, polipéptido, molécula pequeña o ácido nucleico. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o deleción que aumenta la estabilidad del polipéptido de FGF-21 en comparación con la estabilidad del FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o deleción. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o deleción que modula la inmunogenicidad del polipéptido de FGF-21 en comparación con la inmunogenicidad del FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o deleción. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o deleción que modula la semivida en suero o tiempo en circulación del polipéptido de FGF-21 en comparación con la semivida en suero o tiempo en circulación del FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o deleción.

45 En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o deleción que aumenta la solubilidad acuosa del polipéptido de FGF-21 en comparación con la solubilidad acuosa del FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o deleción. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o deleción que aumenta la solubilidad del polipéptido de FGF-21 producido en una célula huésped en comparación con la solubilidad del FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o deleción. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o deleción que aumenta la expresión del polipéptido de FGF-21 en una célula huésped o aumenta la síntesis *in vitro* en comparación con la expresión o síntesis del FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o deleción. El polipéptido de FGF-21 que comprende esta sustitución conserva la actividad agonista y conserva o mejora los

niveles de expresión en una célula huésped. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o delección que aumenta la resistencia a proteasa del polipéptido de FGF-21 en comparación con la resistencia a proteasa del FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o delección. La Patente de Estados Unidos N° 6.716.626 indicó que los sitios potenciales que pueden sustituirse para alterar la escisión por proteasa incluyen, pero sin limitación, un sitio monobásico a una distancia de 2 restos de una prolina. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o delección que modula la actividad de transducción de señales del receptor de FGF-21 en comparación con la actividad del receptor tras su interacción con el polipéptido de FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o delección. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o delección que modula su unión con otra molécula tal como un receptor en comparación con la unión del polipéptido de FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o delección.

En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 comprende una sustitución, adición o delección que aumenta la compatibilidad del polipéptido de FGF-21 con conservantes farmacéuticos (por ejemplo, *m*-cresol, fenol, alcohol bencílico) en comparación con la compatibilidad del FGF-21 correspondiente sin la sustitución, adición o delección. Esta compatibilidad aumentada permitiría la preparación de una formulación farmacéutica conservada que mantuviera las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica de la proteína durante el almacenamiento. El documento WO 2005/091944 analiza los siguientes ejemplos de muteínas de FGF-21 con estabilidad farmacéutica mejorada: la sustitución con un aminoácido cargado y/o polar pero no cargado de uno de los siguientes: glicina 42, glutamina 54, arginina 77, alanina 81, leucina 86, fenilalanina 88, lisina 122, histidina 125, arginina 126, prolina 130, arginina 131, leucina 139, alanina 145, leucina 146, isoleucina 152, alanina 154, glutamina 156, glicina 161, serina 163, glicina 170 o serina 172 de la SEC ID N°: 1 del documento WO 05/091944. Un polipéptido de FGF-21 de la presente divulgación puede incluir una o más de estas sustituciones en la posición correspondiente en el polipéptido y/o puede incluir una o más sustituciones, adiciones o delecciones distintas. En algunas realizaciones de la divulgación, uno o más aminoácidos no naturales se sustituyen en una o más de las siguientes posiciones: glicina 42, glutamina 54, arginina 77, alanina 81, leucina 86, fenilalanina 88, lisina 122, histidina 125, arginina 126, prolina 130, arginina 131, leucina 139, alanina 145, prolina/leucina 146, isoleucina 152, alanina 154, glutamina 156, glicina 161, serina 163, glicina 170, serina 172 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En algunas realizaciones de la divulgación, uno o más aminoácidos no naturales se sustituyen en una o más de las siguientes posiciones: glutamato 91, arginina 131, glutamina 108, arginina 77, arginina 72, histidina 87, leucina 86, arginina 126, glutamato 110, tirosina 83, prolina 146, arginina 135, arginina 96, arginina 36 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7).

El documento WO 05/091944 describe muteínas adicionales de FGF-21 con estabilidad farmacéutica potenciada. Dichas muteínas incluyen la sustitución con una cisteína de dos o más de los siguientes en FGF-21 (véase la SEC ID N°: 1 del documento WO 05/091944): arginina 19, tirosina 20, leucina 21, tirosina 22, treonina 23, aspartato 24, aspartato 25, alanina 26, glutamina 27, glutamina 28, alanina 31, leucina 33, isoleucina 35, leucina 37, valina 41, glicina 42, glicina 43, glutamato 50, glutamina 54, leucina 58, valina 62, leucina 66, glicina 67, lisina 69, arginina 72, fenilalanina 73, glutamina 76, arginina 77, aspartato 79, glicina 80, alanina 81, leucina 82, glicina 84, serina 85, prolina 90, alanina 92, serina 94, fenilalanina 95, leucina 100, aspartato 102, tirosina 104, tirosina 107, serina 109, glutamato 110, prolina 115, histidina 117, leucina 118, prolina 119, asparagina 121, lisina 122, serina 123, prolina 124, histidina 125, arginina 126, aspartato 127, alanina 129, prolina 130, glicina 132, alanina 134, arginina 135, leucina 137, prolina 138 o leucina 139. Los polipéptidos de FGF-21 de la presente divulgación pueden incluir una o más de estas sustituciones en la posición correspondiente en el polipéptido y/o pueden incluir una o más sustituciones, adiciones o delecciones distintas. En algunas realizaciones de la divulgación, uno o más aminoácidos no naturales se sustituyen en una o más de las siguientes posiciones: arginina 19, tirosina 20, leucina 21, tirosina 22, treonina 23, aspartato 24, aspartato 25, alanina 26, glutamina 27, glutamina 28, alanina 31, leucina 33, isoleucina 35, leucina 37, valina 41, glicina 42, glicina 43, glutamato 50, glutamina 54, leucina 58, valina 62, leucina 66, glicina 67, lisina 69, arginina 72, fenilalanina 73, glutamina 76, arginina 77, aspartato 79, glicina 80, alanina 81, leucina 82, glicina 84, serina 85, prolina 90, alanina 92, serina 94, fenilalanina 95, leucina 100, aspartato 102, tirosina 104, tirosina 107, serina 109, glutamato 110, prolina 115, histidina 117, leucina 118, prolina 119, asparagina 121, lisina 122, serina 123, prolina 124, histidina 125, arginina 126, aspartato 127, alanina 129, prolina 130, glicina 132, alanina 134, arginina 135, leucina 137, prolina 138 o leucina 139 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7).

El documento WO 05/091944 describe adicionalmente muteínas específicas de FGF-21 con enlaces disulfuro obtenidos por ingeniería genética (aminoácidos sustituidos con cisteína), además del de origen natural en Cys75-Cys93, que son como se indica a continuación: Gln76Cys-Ser109Cys, Cys75-Ser85Cys, Cys75-Ala92Cys, Phe73Cys-Cys93, Ser123Cys-His125Cys, Asp102Cys-Tyr104Cys, Asp127Cys-Gly132Cys, Ser94Cys-Glu110Cys, Pro115Cys-His117Cys, Asn121Cys-Asp127Cys, Leu100Cys-Asp102Cys, Phe95Cys-Tyr107Cys, Arg19Cys-Pro138Cys, Tyr20Cys-Leu139Cys, Tyr22Cys-Leu137Cys, Arg77Cys-Asp79Cys, Pro90Cys-Ala92Cys, Glu50Cys-Lys69Cys, Thr23Cys-Asp25Cys, Ala31Cys-Gly43Cys, Gln28Cys-Gly43Cys, Thr23Cys-Gln28Cys, Val41Cys-Leu82Cys, Leu58Cys-Val62Cys, Gln54Cys-Leu66Cys, Ile35Cys-Gly67Cys, Gly67Cys-Arg72Cys, Ile35Cys-Gly84Cys, Arg72Cys-Gly84Cys o Arg77Cys-Ala81Cys, en los que la numeración se basa en SEC ID N°: 1 del documento WO 05/091944. Son muteínas adicionales con enlaces disulfuro obtenidos por ingeniería genética Tyr22Cys-Leu139Cys; Asp24Cys-Arg135Cys; Leu118Cys-Gly132Cys; His117Cys-Pro130Cys; His117Cys-

Ala129Cys; Leu82Cys-Pro119Cys; Gly80Cys-Ala129Cys; Gly43Cys-Pro124Cys; Gly42Cys-Arg126Cys; Gly42Cys-Pro124Cys; Gln28Cys-Pro124Cys; Gln27Cys-Ser123Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; o Asp25Cys-Lys122Cys, en los que la numeración se basa en la SEC ID N°: 1 del documento WO 05/091944. Son muteínas adicionales con enlaces disulfuro obtenidos por ingeniería genética Leu118Cys-Ala134Cys; Leu21Cys-Leu33Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; Leu21Cys-Leu33Cys/Leu118Cys-Ala134Cys, en los que la numeración se basa en SEC ID N°: 1 del documento WO 05/091944. Los polipéptidos de FGF-21 de la presente divulgación pueden incluir una o más de estas sustituciones en la posición o posiciones correspondientes en el polipéptido y/o pueden incluir una o más sustituciones, adiciones o deleciones distintas. Los polipéptidos de FGF-21 de la presente divulgación pueden incluir una o más de estas sustituciones en la posición o posiciones correspondientes en el polipéptido (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En algunas realizaciones, los polipéptidos de FGF-21 de la presente divulgación pueden una o más de estas sustituciones en las posiciones correspondientes desde antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) hasta el extremo C terminal de las SEC ID N°: 34-36.

El documento WO 05/091944 describe muteínas adicionales de FGF-21 que se PEGilaron. Estas muteínas tenían una de las siguientes sustituciones: D25C, D38C, L58C, K59C, P60C, K69C, D79C, H87C, E91C, E101C, D102C L114C, L116C, K122C, R126C, P130C, P133C y P140C. Los polipéptidos de FGF-21 de la presente divulgación pueden incluir una o más de estas sustituciones en la posición correspondiente en el polipéptido y/o pueden incluir una o más sustituciones, adiciones o deleciones diferentes. En algunas realizaciones de la divulgación, uno o más aminoácidos no naturales se sustituyen en una o más de las siguientes posiciones: 25, 38, 58, 59, 60, 69, 79, 87, 91, 101, 102, 114, 116, 122, 126, 130, 133, 140 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En algunas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención pueden incluir una o más de estas sustituciones en las posiciones correspondientes desde antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) hasta el extremo C terminal en las SEC ID N°: 34-36.

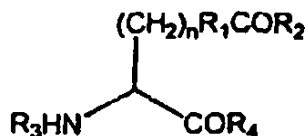
El documento WO 05/091944 describe sustituciones de cisteína en las siguientes posiciones: 19, 21, 26, 28, 29, 30, 36, 39, 42, 50, 56, 61, 64, 65, 68, 70, 71, 77, 81, 85, 86, 90, 92, 94, 98, 107, 108, 112, 113, 123 y 124. El documento WO 05/091944 indica sustituciones de cisteína en las siguientes posiciones: 24, 27, 37, 40, 44, 46, 49, 57, 88, 89, 106, 110, 111, 115, 120 y 139. El documento WO 05/091944 también describe sustituciones de cisteína en las siguientes posiciones: 18, 45, 47, 48, 78, 83, 99, 103, 125, 128, 131, 132 y 138. El documento WO 05/091944 también describe sustituciones de cisteína en las siguientes posiciones: 25, 38, 58, 59, 60, 69, 79, 87, 91, 101, 102, 114, 116, 122, 126, 130, 133 y 140.

En algunas realizaciones, se crean uno o más enlaces obtenidos por ingeniería genética con uno o más aminoácidos no naturales. El enlace intramolecular puede crearse de muchas maneras incluyendo, pero sin limitación, una reacción entre dos aminoácidos en la proteína en condiciones adecuadas (uno o los dos aminoácidos pueden ser un aminoácido no natural); una reacción con dos aminoácidos, cada uno de los cuales puede ser codificado de forma natural o no codificado de forma natural, con un engarce, polímero u otra molécula en condiciones adecuadas; etc.

En algunas realizaciones de la divulgación, uno o más sustituciones de aminoácidos en el polipéptido de FGF-21 puede ser con uno o más aminoácidos de origen natural o de origen no natural. En algunas realizaciones de la divulgación, las sustituciones de aminoácidos en el polipéptido de FGF-21 pueden ser con aminoácidos de origen natural o de origen no natural, siempre que al menos una sustitución sea con un aminoácido no codificado de forma natural. En algunas realizaciones de la divulgación, una o más sustituciones de aminoácidos en el polipéptido de FGF-21 puede ser con uno o más aminoácidos de origen natural, y adicionalmente al menos una sustitución es con un aminoácido no codificado de forma natural.

En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo carbonilo, un grupo acetilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo carbonilo. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural tiene la estructura:

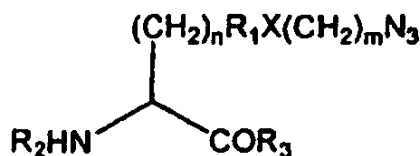


en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R₂ es H, un alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación amino terminal y R₄ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación carboxilo terminal.

En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo aminooxi. En algunas

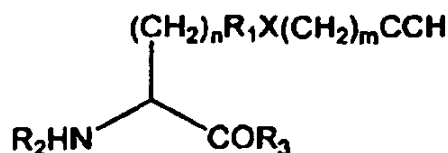
realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo hidrazida. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo hidrazina. En algunas realizaciones, el resto de aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo semicarbazida.

5 En algunas realizaciones, el resto de aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo azida. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural tiene la estructura:



10 en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación amino terminal y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación carboxilo terminal.

En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo alquino. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural tiene la estructura:



15 en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación amino terminal y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación carboxilo terminal.

20 En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido es un polipéptido de FGF-21 agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso comprende un aminoácido no codificado de forma natural ligado a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso comprende un aminoácido no codificado de forma natural y una o más modificaciones postraduccionales, engarces, polímeros o moléculas biológicamente activas.

25 La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con las SEC ID N°: 8-14. La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con las SEC ID N°: 8-14, comprendiendo el polinucleótido al menos un codón selector. La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos mostrados como SEC ID N°: 1-7.

30 La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos mostrados como SEC ID N°: 1-7 con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la materia que varios polinucleótidos diferentes pueden codificar cualquier polipéptido de la presente invención.

35 En algunas realizaciones, el codón selector se selecciona del grupo que consiste en un codón ámbar, codón ocre, codón ópalo, un codón único, un codón poco común, un codón de cinco bases y un codón de cuatro bases.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para preparar un polipéptido de FGF-21 unido a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende poner en contacto un polipéptido de FGF-21 aislado que comprende un aminoácido no codificado de forma natural con un polímero soluble en agua que comprende un resto que reacciona con el aminoácido no codificado de forma natural. En algunas realizaciones,

40 el aminoácido no codificado de forma natural incorporado en el polipéptido de FGF-21 es reactivo para un polímero soluble en agua que de otro modo no es reactivo para ninguno de los 20 aminoácidos comunes. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural incorporado en el polipéptido de FGF-21 es reactivo para un engarce, polímero o molécula biológicamente activa que de otro modo no es reactiva para ninguno de los 20 aminoácidos comunes.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido de FGF-21 unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido que contiene carbonilo con una molécula de

poli(etilenglicol) que comprende un grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida. En algunas realizaciones, el grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida está unido a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido de FGF-21 unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un grupo carbonilo con un polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que comprende un grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida.

10 En algunas realizaciones, el polipéptido de FGF-21 unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido que contiene alquino con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un resto azida. En algunas realizaciones, el grupo azida o alquino se une a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido de FGF-21 unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido que contiene azida con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un resto alquino. En algunas realizaciones, el grupo de azida o alquino se une a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.

En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa. En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre 0,1 kDa y 50 kDa.

20 En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. En algunas realizaciones, cada rama del polímero ramificado de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre 1 kDa y 100 kDa o entre 1 kDa y 50 kDa.

25 En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua unido al polipéptido de FGF-21 comprende un resto de polialquilenglicol. En algunas realizaciones, el resto de aminoácido no codificado de forma natural incorporado en el polipéptido de FGF-21 comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazida, una hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino. En algunas realizaciones, el resto de aminoácido no codificado de forma natural incorporado en el polipéptido de FGF-21 comprende un resto carbonilo y el polímero soluble en agua comprende un resto aminooxi, hidrazida, hidrazina o semicarbazida. En algunas realizaciones, el resto de aminoácido no codificado de forma natural incorporado en el polipéptido de FGF-21 comprende un resto alquino y el polímero soluble en agua comprende un resto azida. En algunas realizaciones, el resto de aminoácido no codificado de forma natural incorporado en el polipéptido de FGF-21 comprende un resto azida y el polímero soluble en agua comprende un resto alquino.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural está unido a un polímero soluble en agua.

35 La presente divulgación también proporciona células que comprenden un polinucleótido que codifica el polipéptido de FGF-21 que comprende un codón selector. En algunas realizaciones de la divulgación, las células comprenden una ARN sintetasa ortogonal y/o un ARNt ortogonal para sustituir un aminoácido no codificado de forma natural en el polipéptido de FGF-21.

40 La presente divulgación también proporciona procedimientos para preparar un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural. En algunas realizaciones de la divulgación, los procedimientos comprenden cultivar células que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican un polipéptido de FGF-21, una ARN sintetasa ortogonal y/o un ARNt ortogonal en condiciones que permiten la expresión del polipéptido de FGF-21; y purificar el polipéptido de FGF-21 de las células y/o el medio de cultivo.

45 La presente invención también proporciona procedimientos para aumentar la semivida terapéutica, semivida en suero o tiempo en circulación de polipéptidos de FGF-21. La presente invención también proporciona procedimientos para modular la inmunogenicidad de polipéptidos de FGF-21. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden sustituir con un aminoácido no codificado de forma natural un aminoácido de polipéptidos de FGF-21 de origen natural en la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7) y/o unir el polipéptido de FGF-21 con un engarce, un polímero, un polímero soluble en agua; o una molécula biológicamente activa.

50 La presente divulgación también proporciona procedimientos para tratar a un paciente que necesita dicho tratamiento con una cantidad eficaz de una molécula de FGF-21 de la presente invención. En algunas realizaciones de la divulgación, los procedimientos comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El aminoácido no codificado de forma natural se une a un polímero soluble en agua.

5 La presente invención también proporciona polipéptidos de FGF-21 que comprenden una secuencia mostrada en las SEC ID N°: 1-7 o cualquier otra secuencia de polipéptidos de FGF-21, excepto porque un aminoácido se ha sustituido por un aminoácido no codificado de forma natural en la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). La presente divulgación también proporciona polipéptidos de FGF-21 que comprenden una secuencia mostrada como SEC ID N°: 1, 2, 4 y 5. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural se une a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

10 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de FGF-21 que comprende la secuencia mostrada en las SEC ID N°: 1-7 o cualquier otra secuencia de polipéptido de FGF-21, en las que un aminoácido se ha sustituido por un aminoácido no codificado de forma natural en la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de FGF-21 que comprende la secuencia mostrada en las SEC ID N°: 1-7, excepto porque un aminoácido en la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7) se ha sustituido por un aminoácido no codificado de forma natural. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de forma natural comprende un resto de sacárido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua se une al polipéptido mediante un resto de sacárido. En algunas realizaciones, un engarce, polímero o molécula biológicamente activa se une al polipéptido de FGF-21 mediante un resto de sacárido.

La presente invención también proporciona un polipéptido de FGF-21 que comprende un polímero soluble en agua unido por un enlace covalente con el polipéptido de FGF-21 en un solo aminoácido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol). El aminoácido unido covalentemente con el polímero soluble en agua es un aminoácido no codificado de forma natural presente en el polipéptido.

25 La presente invención proporciona un polipéptido de FGF-21 que comprende al menos un engarce, polímero o molécula biológicamente activa, estando dicho engarce, polímero o molécula biológicamente activa unida al polipéptido a través de un grupo funcional de aminoácido no codificado de forma natural incorporado por ribosomas en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido está monoPEGilado. La presente invención también proporciona un polipéptido de FGF-21 que comprende un engarce, polímero o molécula biológicamente activa que está unida a un aminoácido no codificado de forma natural estando dicho aminoácido no codificado de forma natural por ribosomas en el polipéptido en sitios preseleccionados.

30 Dentro del alcance de la presente invención se incluyen la secuencia señal o líder de FGF-21 unida a una región codificante de FGF-21, así como una secuencia señal heteróloga unida a una región codificante de FGF-21. La secuencia señal o líder heteróloga seleccionada debe ser una que se reconozca y procese, por ejemplo, por el sistema de secreción de la célula huésped para secretarse y posiblemente escindirse por una peptidasa señal, por la célula huésped. Pueden seleccionarse secuencias líder de la presente divulgación de las siguientes: el líder de tres leucinas de la SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6 (posiciones de aminoácidos 1-28), el líder de dos leucinas de la SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 7 (posiciones de aminoácidos 1-27), el marcador de His de la SEC ID N°: 2 (posiciones de aminoácidos 1-10), SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41, SEC ID N°: 42, SEC ID N°: 43, SEC ID N°: 44. Se entiende que un procedimiento para tratar una afección o trastorno con el FGF-21 de la presente invención implica el tratamiento con FGF-21 con o sin péptido señal o líder.

45 La presente divulgación también proporciona procedimientos para inducir un aumento de la captación de glucosa en adipocitos, comprendiendo dicho procedimiento administrar FGF-21 a dichas células en una cantidad eficaz para inducir un aumento de la captación de glucosa. Dicho aumento de la captación de glucosa puede provocar un aumento del gasto de energía por una utilización de glucosa más rápida y más eficaz.

50 En otra realización, la conjugación del polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido de origen no natural con otra molécula, incluyendo pero sin limitación PEG, proporciona FGF-21 sustancialmente purificado debido a la reacción química única utilizada para conjugación con el aminoácido no natural. La conjugación de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural con otra molécula, tal como PEG, puede realizarse con otras técnicas de purificación realizadas antes o después de la etapa de conjugación para proporcionar FGF-21 sustancialmente puro.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 – Se muestran mutaciones ámbar en FGF-21 y sitios correspondientes en FGF-19.

Figura 2 – Se muestra la estructura de FGF-19 humano.

55 Figura 3 - Se muestran mutaciones ámbar en FGF-21 y sitios correspondientes en FGF-2.

Figura 4 - Se muestra la estructura de FGF-19 humano.

Figura 5 – Se muestra la expresión de FGF-21 marcado con His N terminal y supresión en 7 sitios ámbar.

Figura 6 – Se muestran muestras de sobrenadante BPER de la expresión de FGF-21 marcado con His N terminal y supresión en 7 sitios ámbar.

5 Figura 7a - SigmaPlot que calcula los valores de CE50 para diluciones seriadas de las variantes de FGF21 30K PEG-391, 30K PEG-477, 30K PEG-R131, 30K PEG-Q108, HIS-FGF21 (tipo silvestre marcado con His).

Figura 7b – Una tabla que muestra la pérdida media en veces de actividad para cada una de las variantes de FGF-21 pegilado enumeradas.

Figura 8 – Un análisis de SDS-PAGE de FGF-21 no marcado con His expresado en *E. coli*.

10 Figura 9 - (A) análisis de SDS-PAGE de fracciones de elución de Y83pAF FGF-21. (B) Cromatograma de elución de elución de Q HP de Y83pAF FGF-21 no marcado. (C) Análisis de SDS-PAGE de grupo de elución de HP Y832pAFQ FGF-21.

Figura 10 – Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 11 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 12 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

15 Figura 13 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 14 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 15 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 16 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 17 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

20 Figura 18 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 19 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 20 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 21 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 22 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

25 Figura 23 - Datos del Ejemplo 28, propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas.

Figura 24 – Mapa del vector pVK10-FGF21.

Figura 25 – Secuencia del vector pVK10-FGF21.

30 Figura 26a – Perfiles de concentración en suero-tiempo de tres dosis de FGF21 WT N-6His en ratas. Se proporcionó a ratas una sola administración de artículos de ensayo por vía subcutánea. N = 4 animales por grupo. Los símbolos indican las medias de concentraciones en suero medidas, las barras de error indican el error típico.

35 Figura 26b – Perfiles de concentración en suero-tiempo de FGF21 WT N-6His dosificado por vía subcutánea o por vía intravenosa a 0,25 mg/kg. Se proporcionó a las ratas una sola administración de artículos de ensayo por vía subcutánea. N = 4 animales por grupo. Los símbolos indican las medias de concentraciones en suero medidas, las barras error indican el error típico. La biodisponibilidad total es ~87%.

Figura 27a – Relación de dosis y concentración en suero del artículo de ensayo a $C_{m\acute{a}x}$. Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ se presentan como no teóricos observados. N = 4 animales por grupo de tratamiento. El valor de regresión lineal es 0,59 con una pendiente de $348,5 \pm 91,22$.

40 Figura 27b – Relación de dosis y semivida terminal del artículo de ensayo. N = 4 animales por grupo de tratamiento. El valor de regresión lineal no pudo calcularse debido a una aparente saturación de aclaramiento por encima de 0,25 mg/kg.

Figura 27c – Relación de dosis y AUC de concentración en suero. Los valores de AUC se presentan como observados calculados hasta el infinito. N = 4 animales por grupo de tratamiento. El valor de regresión lineal es 0,75 con una pendiente de $1079 \pm 194,1$.

Figura 28a – Perfiles de concentración en suero-tiempo de tres dosis de FGF21 WT PP en ratas. Se proporcionó a ratas una sola administración de artículo de ensayo por vía subcutánea. N = 4 animales por grupo. Los símbolos indican las medias de concentraciones en suero medidas, las barras de error indican el error típico.

5 Figura 28b - Perfiles de concentración en suero-tiempo de FGF21 WT PP dosificado por vía subcutánea o por vía intravenosa a 0,25 mg/kg. Se proporcionó a ratas una sola administración de artículos de ensayo por vía subcutánea. N = 4 animales por grupo. Los símbolos indican las medidas de concentraciones en suero medidas, las barras de error indican el error típico. La biodisponibilidad total es ~65%.

10 Figura 29a – Relación de dosis y concentración en suero del artículo de ensayo a $C_{m\acute{a}x}$. Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ se presentan como no teóricos observados. N = 4 animales por grupo de tratamiento. El valor de regresión lineal es 0,92 con una pendiente de $454,2 \pm 42,42$.

Figura 29b – Relación de dosis y semivida terminal del artículo de ensayo. N = animales por grupo de tratamiento. El valor de regresión lineal no pudo calcularse debido a una aparente saturación de aclaramiento por encima de 0,125 mg/kg.

15 Figura 29c – Relación de dosis y AUC de concentración en suero. Los valores de AUC se presentan como observados calculados hasta el infinito. N = 4 animales por grupo de tratamiento. El valor de regresión lineal es 0,93 con una pendiente de $1585 \pm 137,1$.

20 Figura 30a – Comparación de semivida terminal calculada para PP frente a compuestos de FGF-21 WT N6-His dosificados a 0,5 mg/kg por vía subcutánea en ratas. El valor p calculado usando un ensayo de t de dos colas es 0,7715. N = 3-4 animales por grupo.

Figura 30b – Comparación de los valores de $C_{m\acute{a}x}$ para PP frente a compuestos de FGF-21 WT N6-His dosificados a 0,5 mg/kg por vía subcutánea en ratas. El valor p calculado usando un ensayo de t de dos colas es 0,7652. N = 3-4 animales por grupo.

25 Figura 30c – Comparación de AUC_{inf} para PP frente a compuestos de FGF-21 WT N6-His dosificados a 0,5 mg/kg por vía subcutánea en ratas. El valor p calculado usando un ensayo de t de dos colas es 0,4372.

Figura 31a – Perfiles PK de diez isómeros de FGF21 marcados con N6-His PEGilado.

Figura 31b – Perfiles de absorción para isómeros de FGF21 PEGilado después de inyección subcutánea de 0,25 mg/kg.

30 Figura 31c – Perfiles de eliminación para isómeros de FGF21 PEGilado después de inyección subcutánea de 0,25 mg/kg.

Figura 32 – Comparación farmacocinética de PEGilación de 20 y 30 kDa.

35 Figura 33 – Curvas de concentración en plasma – tiempo para ratas a las que se dosificó por vía intravenosa o vía subcutánea con 0,25 mg/kg de 20KPEG-pAF91(N6-His)FGF21. Se administró una sola dosis a cada animal. N = 4 animales por grupo. Los símbolos indican las medidas de las concentraciones en plasma medidas, las barras indican la desviación típica. La biodisponibilidad total es ~30%.

Figura 34 – Dos geles que muestran la secreción de FGF21 en *E. coli* y la exposición de los líderes usados, indican que OmpA, MalE y Stil actuaron muy bien, como se demostró por la fracción soluble de liberación periplásmica en el segundo gel.

Definiciones

40 Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, construcciones y reactivos particulares descritos en el presente documento y, por lo tanto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se limitará solamente por las reivindicaciones adjuntas.

45 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen la referencia plural a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un “FGF-21” o “polipéptido de FGF-21” es una referencia a una o más de dichas proteínas e incluye equivalentes de las mismas conocidos por los expertos habituales en la materia, y así sucesivamente.

50 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier procedimiento, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayos de la invención, a continuación se describen los

procedimientos, dispositivos y materiales preferidos.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en el presente documento tienen el fin de describir y desvelar, por ejemplo, las construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones, que podrían usarse en relación con la invención descrita en el presente documento. Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan solamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada del presente documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de invención previa o por cualquier otra razón.

La expresión “sustancialmente purificado” se refiere a un polipéptido de FGF-21 que puede estar sustancialmente o esencialmente sin componentes que normalmente acompañan o interaccionan con la proteína como se encuentra en su ambiente natural, es decir, una célula nativa o célula huésped en el caso de polipéptidos de FGF-21 producidos de forma recombinante. El polipéptido de FGF-21 que puede estar sustancialmente sin material celular incluye preparaciones de proteínas que tienen menos de aproximadamente un 30%, menos de aproximadamente un 25%, menos de aproximadamente un 20%, menos aproximadamente un 15%, menos de aproximadamente un 10%, menos de aproximadamente un 5%, menos de aproximadamente un 4%, menos de aproximadamente un 3%, menos de aproximadamente un 2% o menos de aproximadamente un 1% (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el polipéptido de FGF-21 o variante del mismo se produce de forma recombinante por las células huésped, la proteína puede estar presente a aproximadamente un 30%, aproximadamente un 25%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 4%, aproximadamente un 3%, aproximadamente un 2% o aproximadamente un 1% o menos del peso seco de las células. Cuando el polipéptido de FGF-21 o variante del mismo se produce de forma recombinante por las células huésped, la proteína puede estar presente en el medio de cultivo a aproximadamente 5 g/l, aproximadamente 4 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 10 mg/l o aproximadamente 1 mg/l o menos del peso seco de las células. Por lo tanto, el polipéptido de FGF-21 “sustancialmente purificado” como se produce por los procedimientos de la presente divulgación puede tener un nivel de pureza de al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 35%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 45%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 55%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 70%, específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente un 75%, 80%, 85% y, más específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente un 90%, un nivel de pureza de al menos aproximadamente un 95%, un nivel de pureza de al menos aproximadamente un 99% o mayor, determinado por procedimientos apropiados tales como análisis de SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

Una “célula huésped recombinante o “célula huésped” se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, independientemente del procedimiento usado para inserción, por ejemplo, captación directa, transducción, acoplamiento f, u otros procedimientos conocidos en la técnica para crear células huésped recombinantes. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido o, como alternativa, puede integrarse en el genoma del huésped.

Como se usa en el presente documento, el término “medio” o “medios” incluye cualquier medio de cultivo, solución, soporte sólido, semisólido o rígido que pueda soportar o contener cualquier célula huésped, incluyendo células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insecto, células huésped vegetales, células huésped eucariotas, células huésped de mamíferos, células CHO, células huésped procariotas, *E. coli* o células huésped de pseudomonas y contenidos celulares. Por lo tanto, el término puede abarcar medio en el que la célula huésped ha crecido, por ejemplo, medio en el que se ha secretado el polipéptido de FGF-21, incluyendo medio antes o después de una etapa de proliferación. El término también puede abarcar tampones o reactivos que contienen lisados de células huésped, tal como en el caso en el que el polipéptido de FGF-21 se produce de forma intracelular y las células huésped se lisan o rompen para liberar el polipéptido de FGF-21.

“Agente reductor”, como se usa en el presente documento con respecto al replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que mantiene grupos sulfhidrilo en el estado reducido y reduce enlaces disulfuro intra- o intermoleculares. Los agentes reductores adecuados incluyen, pero sin limitación, ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol, ditioueritritol, cisteína, cisteamina (2-aminoetanotiol) y glutatión reducido. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la materia que una amplia diversidad de agentes reductores son adecuados para su uso en los procedimientos y composiciones de la presente invención.

“Agente oxidante”, como se usa en el presente documento con respecto al replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que es capaz de retirar un electrón de un compuesto que se oxida. Los agentes oxidantes adecuados incluyen, pero sin limitación, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitól oxidado, eritritol oxidado y oxígeno. Es fácilmente evidente para los expertos en la materia que una amplia diversidad de agentes oxidantes son adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención.

La expresión “agente antidiabético” significa cualquier fármaco que es útil en el tratamiento, prevención o reducción de otro modo de la gravedad de cualquier trastorno del metabolismo de la glucosa o cualquier complicación del

mismo, incluyendo cualquiera de las afecciones, enfermedades o complicaciones descritas en el presente documento. Los agentes antidiabéticos incluyen insulina, tiazolidinodionas, sulfonilureas, derivados de ácido benzoico, inhibidores de alfa-glucosidasa o similares. Otras categorías generales de agentes antidiabéticos que pueden ser parte de una composición objeto incluyen (estando los términos definidos entre comillas): “artículos farmacológicos” reconocidos en la Farmacopea de Estados Unidos oficial o el Formulario Nacional oficial (o cualquier suplemento del mismo); “nuevo fármaco” y “nuevo fármaco animal” aprobado por la FDA de los Estados Unidos como se usan esas expresiones en el Título 21 del Código de los Estados Unidos; cualquier fármaco que requiera la aprobación de una entidad gubernamental, en Estados Unidos o en el extranjero (“fármaco aprobado”); cualquier fármaco para el que sea necesario obtener la aprobación reguladora para cumplir 21 U.S.C. §355(a) (“fármaco aprobado por organismo regulador”); cualquier agente que sea o fuera objeto de una solicitud de fármaco humano según 21 U.S.C. §379(g) (“fármaco humano”). (Todas las referencias al código estatutario para esta definición se refieren a dicho código en la fecha de presentación original de la presente solicitud). Otros agentes antidiabéticos se desvelan en el presente documento, y se conocen por los expertos en la materia. Se prefiere que las composiciones antidiabéticas de la invención, como se usa en el presente documento, sean capaces de reducir los niveles de HbA1c en un cambio de al menos un 10% desde el valor basal, y se prefiere más particularmente que las composiciones antidiabéticas de la invención, como se usa en el presente documento, sean capaces de reducir los niveles de HbA1c en un cambio de al menos un 50% desde el valor basal. Los agentes antidiabéticos incluyen potenciadores de insulina tales como incluyendo, pero sin limitación, potenciadores de insulina de molécula pequeña, Taurina, Ácido Alfa Lipoico, un extracto de Mora, Cromo, Glutamina, *Enicostemma littorale Blume*, *Scoparia dulcis*, un extracto de Estragón, *Andrographis paniculata*, Isomaltosa, Trealosa o D-Manosa que puede potenciar adicionalmente la secreción o actividad de la insulina.

“Agente desnaturizante” o “desnaturizante”, como se usa en el presente documento, se define como cualquier compuesto o material que provocará un desplegamiento reversible de una proteína. La potencia de un desnaturizante o agente desnaturizante se determinará tanto por las propiedades como por la concentración del desnaturizante o agente desnaturizante particular. Los desnaturizantes o agentes desnaturizantes adecuados pueden ser caótopos, detergentes, disolventes orgánicos, disolventes miscibles en agua, fosfolípidos o una combinación de dos o más de dichos agentes. Los caótopos adecuados incluyen, pero sin limitación, urea, guanidina y tiocianato sódico. Los detergentes útiles pueden incluir, pero sin limitación, detergentes fuertes tales como dodecil sulfato sódico o éteres de polioxietileno (por ejemplo, detergentes Tween o Tritón), Sarkosilo, detergentes no iónicos suaves (por ejemplo, digitonina), detergentes catiónicos suaves tales como N-2,3-(Dioleioxi)-propil-N,N,N-trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (por ejemplo, colato sódico o desoxicolato sódico) o detergentes zwitteriónicos incluyendo, pero sin limitación, sulfobetainas (Zwittergent), 3-(3-colamidopropil) dimetilamonio-1-propano sulfato (CHAPS) y 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propano sulfonato (CHAPSO). Pueden usarse disolventes miscibles en agua orgánicos tales como acetoneitrilo, alcanoles inferiores (especialmente alcanoles C₂ – C₄) tales como etanol o isopropanol), o alcanodiolos inferiores (especialmente alcanodiolos C₂ – C₄ tal como etilenglicol) como desnaturizantes. Los fosfolípidos útiles en la presente invención pueden ser fosfolípidos de origen natural tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol o derivados sintéticos de fosfolípidos o variantes tales como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolina.

“Replegamiento”, como se usa en el presente documento, describe cualquier proceso, reacción o procedimiento que transforma polipéptidos que contienen enlaces disulfuro desde un estado desplegado o plegado de forma inapropiada a una conformación nativa o plegada de forma apropiada con respecto a enlaces disulfuro.

“Coplegamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere específicamente a procesos, reacciones o procedimientos de replegamiento que emplean al menos dos polipéptidos que interaccionan entre sí y dan como resultado la transformación de polipéptidos desplegados o plegados de forma inapropiada en polipéptidos nativos, plegados de forma apropiada.

Como se usa en el presente documento, “polipéptido de FGF-21”, “factor de crecimiento de fibroblastos 21” o “FGF-21” y las formas sin guión de los mismos incluirán los polipéptidos y proteínas que tienen al menos una actividad biológica de un factor de crecimiento de fibroblastos 21, así como análogos de FGF-21, isoformas de FGF-21, miméticos de FGF-21, fragmentos de FGF-21, proteínas de FGF-21 híbridas, proteínas de fusión, oligómeros y multímeros, homólogos, variantes de patrones de glicosilación, variantes, variantes de corte y empalme y muteínas de los mismos, independientemente de la actividad biológica de los mismos, e independientemente además del procedimiento de síntesis o fabricación de los mismos incluyendo, pero sin limitación, procedimientos recombinantes (si se producen a partir de ADNc, ADN genómico, ADN sintético u otra forma de ácido nucleico) *in vitro*, *in vivo*, por microinyección de moléculas de ácido nucleico, sintéticos, transgénicos y activados por genes. La expresión “polipéptido de FGF-21” y “FGF-21” abarca polipéptidos de FGF-21 que comprenden una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos.

Se han descrito sustituciones en una amplia diversidad de posiciones de aminoácidos en FGF-21 de origen natural. Las sustituciones que incluyen, pero sin limitación, las que modulan la estabilidad farmacéutica, aumentan la actividad agonista, aumentan la resistencia a proteasa, convierten el polipéptido en un antagonista, etc. y están incluidas en la expresión “polipéptido de FGF-21” o “FGF-21”.

Para secuencias de FGF-21 que carecen de una secuencia líder, véase la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 5 en el presente documento. Para secuencias de FGF-21 con una secuencia líder, véase la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7 en el presente documento. En algunas realizaciones, los polipéptidos de FGF-21 de la invención son sustancialmente idénticos a las SEC ID N°: 1-7 excepto porque un aminoácido en la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7) se ha sustituido por un aminoácido no codificado de forma natural o cualquier otra secuencia de un polipéptido de FGF-21. Se han identificado múltiples polimorfismos de FGF-21. Se han descrito leucina o prolina en la misma posición en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20010012628 y en la Patente de Estados Unidos N° 6.716.626. Se muestran secuencias señal o líder N terminal que difieren en un aminoácido (leucina) en la Patente de Estados Unidos N° 6.716.626 y Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040259780. Se conocen bien moléculas de ácido nucleico que codifican FGF-21 y polipéptidos de FGF-21 incluyendo mutantes y procedimientos para expresar y purificar polipéptidos de FGF-21 e incluyen, pero sin limitación, los desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 6.716.626; Publicaciones de Patente de Estados Unidos N°: 2005/0176631, 2005/0037457, 2004/0185494, 2004/0259780, 2002/0164713 y 2001/0012628; documentos WO 01/36640; WO 03/011213; WO 03/059270; WO 04/110472; WO 05/061712; WO 05/072769; WO 05/091944; WO 05/113606; WO 06/028595; WO 06/028714; WO 06/050247; WO 06/065582; WO 06/078463.

La expresión "polipéptido de FGF-21" también incluye las sales y profármacos farmacéuticamente aceptables y profármacos de las sales, polimorfos, hidratos, solvatos, fragmentos biológicamente activos, variantes biológicamente activas y estereoisómeros del FGF-21 de origen natural, así como variantes agonistas, miméticas y antagonistas del FGF-21 de origen natural y fusiones con polipéptidos del mismo. Las fusiones que comprenden aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal, carboxilo terminal o ambos, están incluidas en la expresión "polipéptido de FGF-21". Las fusiones ejemplares incluyen, pero sin limitación, por ejemplo metionil FGF-21 en el que una metionina está unida al extremo N terminal de FGF-21 resultante de la expresión recombinante de la forma madura de FGF-21 sin el péptido líder o señal o una parte del mismo (una metionina está unida al extremo N terminal de FGF-21 resultante de la expresión recombinante), fusiones con el fin de la purificación (incluyendo, pero sin limitación, polihistidina o epítopos de afinidad), fusiones con péptidos de unión a albúmina de suero y fusiones con proteínas del suero tales como albúmina de suero. La Patente de Estados Unidos N° 5.750.373 describe un procedimiento para seleccionar nuevas proteínas tales como hormona de crecimiento y variantes de fragmentos de anticuerpo que tienen propiedades de unión alteradas para sus respectivas moléculas receptoras. El procedimiento comprende fusionar un gen que codifica una proteína de interés con el dominio carboxi terminal de la proteína de la cubierta de gen III del fago filamentoso M13. Pueden generarse moléculas quiméricas que comprenden FGF-21 y una o más moléculas adicionales, incluyendo, pero sin limitación, el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) (Reich-Slotky, R. y col., J. Biol. Chem. 270: 29813-29818 (1995)). La molécula quimérica puede contener regiones específicas o fragmentos de una o las dos moléculas FGF-21 y KGF. Cualquiera de estos fragmentos puede prepararse a partir de las proteínas por procedimientos bioquímicos convencionales o expresando un polinucleótido que codifica el fragmento. Puede producirse FGF-21, o un fragmento del mismo, como una proteína de fusión que comprende albúmina de suero humano (HSA) o una parte de la misma. Tales construcciones de fusión son adecuadas para potenciar la expresión del FGF-21, o fragmento del mismo, en una célula huésped eucariota. Las partes ejemplares de HSA incluyen el polipéptido N-terminal (aminoácidos 1-369, 1-419 y longitudes intermedias que comienzan con el aminoácido 1), como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5.766.883 y Publicación de PCT WO97/24445. Otros polipéptidos quiméricos pueden incluir una proteína HSA con FGF-21 o fragmentos del mismo, unida a cada uno de los extremos C terminal y N terminal de la HSA. Tales construcciones de HSA se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 5.876.969. En el documento WO 2005/091944 se describe la expresión de FGF-21 en células de mamífero.

Diversas referencias desvelan la modificación de polipéptidos por conjugación con polímeros o glicosilación. El término "polipéptido de FGF-21" incluye polipéptidos conjugados con un polímero tal como PEG y puede comprender una o más derivatizaciones adicionales de cisteína, lisina u otros restos. Además, el polipéptido de FGF-21 puede comprender un engarce o polímero, pudiendo ser el aminoácido con el que está conjugado el engarce o polímero un aminoácido no natural de acuerdo con la presente invención, o pudiendo estar conjugado con un aminoácido codificado de forma natural utilizando técnicas conocidas en la materia tales como acoplamiento con lisina o cisteína.

Se ha notificado la conjugación con polímeros de FGF-21 y otros polipéptidos. Véase, por ejemplo, el documento WO 2005/091944. La Patente de Estados Unidos N° 4.904.584 desvela polipéptidos empobrecidos con respecto a lisina PEGilados, en los que al menos un resto de lisina se ha suprimido o reemplazado con cualquier otro resto de aminoácido. El documento WO 99/67291 desvela un procedimiento para conjugar una proteína con PEG, en el que al menos un resto de aminoácido en la proteína se suprime y la proteína se pone en contacto con PEG en condiciones suficientes para conseguir la conjugación con la proteína. El documento WO 99/03887 desvela variantes PEGiladas de polipéptidos que pertenecen a la superfamilia de hormonas del crecimiento, en las que un resto de cisteína se ha sustituido con un resto de aminoácido no esencial localizado en una región específica del polipéptido. El documento WO 00/26354 desvela un procedimiento para producir una variante polipeptídica glicosilada con alergenicidad reducida, que en comparación con un polipéptido precursor correspondiente comprende al menos un sitio de glicosilación adicional. La Patente de Estados Unidos N° 5.218.092 desvela la modificación del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y otros polipéptidos para introducir al menos una cadena de

carbohidrato adicional en comparación con el polipéptido nativo.

La expresión "polipéptido de FGF-21" también incluye FGF-21 glicosilado, tal como, pero sin limitación, polipéptidos glicosilados en cualquier posición de aminoácido, formas glicosiladas ligadas a N o ligadas a O del polipéptido. También se consideran variantes biológicamente activas del polipéptido de FGF-21 variantes que contienen cambios de un solo nucleótido. Además, también se incluyen variantes de corte y empalme. La expresión "polipéptido de FGF-21" también incluye heterodímeros, homodímeros, heteromultímeros u homomultímeros del polipéptido de FGF-21 de uno cualquiera o más polipéptidos de FGF-21 o cualquier otro polipéptido, proteína, carbohidrato, polímero, moléculas pequeña, engarce, ligando u otra molécula biológicamente activa de cualquier tipo, unida por medios químicos o expresada como una proteína de fusión, así como análogos polipeptídicos que contienen, por ejemplo, delecciones específicas u otras modificaciones pero conservan la actividad biológica.

Todas las referencias a posiciones de aminoácidos de FGF-21 descritas en el presente documento se basan en la posición en la SEC ID N°: 1, a no ser que se especifique de otro modo (es decir, cuando se indica que la comparación se basa en las SEC ID N°: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u otra secuencia de FGF-21). Por ejemplo, el aminoácido de la posición 77 de la SEC ID N°: 1 es una arginina y la arginina correspondiente está localizada en la SEC ID N°: 2 en la posición 87. Los expertos en la materia apreciarán que las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones en la SEC ID N°: 1 pueden identificarse fácilmente en cualquier otra molécula de FGF-21 tal como las SEC ID N°: 2, 3, 4, 5, 6 y 7. Los expertos en la materia apreciarán que las posiciones de aminoácidos correspondientes a posiciones en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o cualquier otra secuencia de FGF-21 pueden identificarse fácilmente en cualquier otra molécula de FGF-21 tal como fusiones, variantes, fragmentos, etc. de FGF-21. Por ejemplo, pueden usarse programas de alineamiento de secuencias tales como BLAST para alinear e identificar una posición particular en una proteína que corresponde a una posición en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u otra secuencia de FGF-21. Se pretende que las sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos descritas en el presente documento en referencia a las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u otra secuencia de FGF-21 también se refieran a sustituciones, delecciones o adiciones en posiciones correspondientes en fusiones, variantes, fragmentos, etc. de FGF-21 descritas en el presente documento o conocidas en la materia y están incluidas de forma expresa por la presente invención.

La expresión "polipéptido de FGF-21" o "FGF-21" incluye polipéptidos de FGF-21 que comprenden una o más sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos. Los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención comprenden modificaciones con uno o más aminoácidos naturales junto con una modificación de aminoácidos no natural. Se han descrito sustituciones ejemplares en una amplia diversidad de posiciones de aminoácidos en polipéptidos de FGF-21 de origen natural, incluyendo pero sin limitación sustituciones que modulan la estabilidad farmacéutica, que modulan una o más de las actividades biológicas del polipéptido de FGF-21 tales como, pero sin limitación, el aumento de la actividad agonista, el aumento de la solubilidad del polipéptido, la reducción de la susceptibilidad a proteasa, la conversión del polipéptido en un antagonista, etc. y están incluidas por la expresión "polipéptido de FGF-21". En algunas realizaciones, el antagonista de FGF-21 comprende un aminoácido no codificado de forma natural unido a un polímero soluble en agua que está presente en una región de unión al receptor de la molécula de FGF-21.

En algunas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 comprenden adicionalmente una adición, sustitución o delección que modula la actividad biológica del polipéptido de FGF-21. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o delecciones puede modular una o más propiedades o actividades de FGF-21. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o delecciones pueden modular la afinidad por el receptor del polipéptido de FGF-21, modular la semivida de circulación, modular la semivida terapéutica, modular la estabilidad del polipéptido, modular la escisión por proteasas, modular la dosis, modular la liberación o biodisponibilidad, facilitar la purificación o mejorar o alterar una vía particular de administración. De forma similar, los polipéptidos de FGF-21 pueden comprender secuencias de escisión por proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpo (incluyendo, pero sin limitación, FLAG, o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo, pero sin limitación, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluyendo, pero sin limitación, biotina) que mejoran la detección (incluyendo, pero sin limitación, GFP), purificación u otros rasgos del polipéptido.

La expresión "polipéptido de FGF-21" también abarca homodímeros, heterodímeros, homomultímeros y heteromultímeros que están unidos incluyendo, pero sin limitación, los unidos directamente mediante cadenas laterales de aminoácidos no codificados de forma natural, con cadenas laterales iguales o diferentes de aminoácidos no codificados de forma natural, con cadenas laterales de aminoácidos codificados de forma natural o indirectamente mediante un engarce. Los enlaces ejemplares incluyen, pero sin limitación, compuestos orgánicos pequeños, polímeros solubles en agua de una diversidad de longitudes tales como poli(etilenglicol) o polidextrano, o polipéptidos de diversas longitudes.

Un "aminoácido no codificado de forma natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína. Otras expresiones que pueden usarse como sinónimos de la expresión "aminoácido no codificado de forma natural" son "aminoácido no natural", "aminoácido no de origen natural", "aminoácido que se produce de forma no natural" y diversas versiones con guión y sin guión de las mismas. La expresión "aminoácido no codificado de forma natural" también incluye, pero sin limitación, aminoácidos que se producen por modificación (por ejemplo, modificaciones postraduccionales) de un aminoácido codificado de forma

natural (incluyendo, pero sin limitación, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero que no se incorporan por sí mismos de forma natural en una cadena polipeptídica creciente por el complejo de traducción. Los ejemplos de tales aminoácidos no de origen natural, incluyen, pero sin limitación, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina y O-fosfotirosina.

5 Un “grupo de modificación amino terminal” se refiere a cualquier molécula que puede unirse con el extremo amino terminal de un polipéptido. De forma similar, un “grupo de modificación carboxi terminal” se refiere a cualquier molécula que puede unirse al extremo carboxi terminal de un polipéptido. Los grupos de modificación terminales incluyen, pero sin limitación, diversos polímeros solubles en agua, péptidos o proteínas tales como albúmina de suero, u otros restos que aumentan la semivida en suero de los péptidos.

10 Las expresiones “grupo funcional”, “resto activo”, “grupo de activación”, “grupo saliente”, “sitio reactivo”, “grupo químicamente reactivo” y “resto químicamente reactivo” se usan en la técnica y en el presente documento para referirse a partes definibles distintas o unidades de una molécula. Las expresiones son en alguna medida sinónimos en la técnica química y se usan en el presente documento para indicar las partes de moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas.

15 El término “enlace” o “engarce” se usan en el presente documento para referirse a grupos o enlaces que normalmente se forman como resultado de una reacción química y típicamente son enlaces covalentes. Los enlaces hidrolíticamente estables significan que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua a valores de pH útiles incluyendo, pero sin limitación, en condiciones fisiológicas durante un período de tiempo prolongado, quizás incluso indefinidamente. Los enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significan que los
 20 enlaces son degradables en agua o soluciones acuosas incluyendo, por ejemplo, sangre. Los enlaces enzimáticamente inestables o degradables significan que el enlace puede degradarse por una o más enzimas. Como se entiende en la técnica, PEG y polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la cadena principal del polímero o en el grupo de engarce entre la cadena principal de polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula de polímero. Por ejemplo, los enlaces de éster formados por la reacción de ácidos
 25 carboxílicos con PEG o ácidos carboxílicos con PEG activados con grupos alcohol en un agente biológicamente activo generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, pero sin limitación, enlaces carbonato; enlaces imina resultantes de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces de éster de fosfato formados por reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son el producto de reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de
 30 reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que son el producto de reacción de un formiato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por grupo amina incluyendo, pero sin limitación, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamida incluyendo, pero sin limitación, en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

35 La expresión “molécula biológicamente activa”, “resto biológicamente activo” o “agente biológicamente activo”, cuando se usa en el presente documento, significa cualquier sustancia que puede afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, ruta, molécula o interacción en relación con un organismo incluyendo, pero sin limitación, virus, bacterias, bacteriófagos, transposones, priones, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se usa en el presente documento, las moléculas biológicamente activas
 40 incluyen, pero sin limitación, cualquier sustancia destinada al diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales, o para potenciar de otro modo el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero sin limitación, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de molécula pequeña, vacunas, inmunógenos, drogas duras, drogas blandas, carbohidratos, átomos o moléculas inorgánicas, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionúclidos, oligonucleótidos, toxoides, toxinas, células procariotas y eucariotas, virus, polisacáridos, ácidos nucleicos y partes de
 45 los mismos obtenidos o derivados de virus, bacterias, insectos, animales o cualquier otra célula o tipo celular, liposomas, micropartículas y micelas. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuadas para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, fármacos, profármacos, radionúclidos, agentes de formación de imágenes, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes anti-ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, toxinas derivadas de microbios y similares.

50 Un “polímero bifuncional” se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales discretos que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos (incluyendo, pero sin limitación, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un engarce bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en un componente biológicamente activo, y otro grupo reactivo con un grupo en un segundo componente biológico, puede usarse para formar un conjugado que incluye el primer componente biológicamente activo, el
 55 engarce bifuncional y el segundo componente biológicamente activo. Se conocen muchos procedimientos y moléculas de engarce para la unión de diversos compuestos a péptidos. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Europa N° 188.256; Patentes de Estados Unidos N° 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789. Un “polímero multifuncional” se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales discretos que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos (incluyendo, pero sin limitación, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o polímero multifuncional puede ser de cualquier peso molecular o longitud deseada, y puede seleccionarse para proporcionar

un espaciado o conformación deseada particular entre una o más moléculas unidas al FGF-21 y su receptor o FGF-21.

Cuando los grupos sustituyentes se especifica por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, incluyen igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que se obtendrán de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, la estructura $-\text{CH}_2\text{O}-$ es equivalente a la estructura $-\text{OCH}_2-$.

El término "sustituyentes" incluye, pero sin limitación, "sustituyentes no interferentes". Los "sustituyentes no interferentes" son los grupos que producen compuestos estables. Los sustituyentes o radicales no interferentes adecuados incluyen, pero sin limitación, halo, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , alcoxi C_1-C_{10} , aralquilo C_1-C_{12} , alkarilo C_1-C_{12} , cicloalquilo C_3-C_{12} , cicloalquenilo C_3-C_{12} , fenilo, fenilo sustituido, toluoilo, xilenilo, bifenilo, alcoialquilo C_2-C_{12} , alcoiarilo C_2-C_{12} , ariloxialquilo C_7-C_{12} , oxiarilo C_7-C_{12} , alquilsulfínilo C_1-C_6 , alquilsulfonilo C_1-C_{10} , $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$ (alquilo C_1-C_{10}), en el que m es de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NRC}(\text{O})-$ (alquilo C_1-C_{10}), $-\text{C}(\text{O})-$ (alquilo C_1-C_{10}), alquil C_2-C_{10} tioalquilo, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ (alquilo C_1-C_{10}), $-\text{OH}$, $-\text{SO}_2$, $=\text{S}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NR}_2$, carbonilo, $-\text{C}(\text{O})-$ (alquil C_1-C_{10})- CF_3 , $-\text{C}(\text{O})-\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$, $-(\text{aril } \text{C}_1-\text{C}_{10})-\text{S}-$ (arilo C_6-C_{10}), $-\text{C}(\text{O})-$ (arilo C_1-C_{10}), $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$ ($-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$ (alquilo C_1-C_{10})), en el que cada m es de 1 a 8, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$, $-\text{C}(\text{S})\text{NR}_2$, $-\text{SO}_2\text{NR}_2$, $-\text{NRC}(\text{O})\text{NR}_2$, $-\text{NRC}(\text{S})\text{NR}_2$, sales de los mismos, y similares. Cada R, como se usa en el presente documento, es H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, aralquilo o alkarilo.

El término "halógeno" incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

El término "alquilo", solo o como parte de otro sustituyente, se refiere, a menos que se indique otra cosa, a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada o cíclico, o una combinación del mismo, que puede estar completamente saturado, mono- o poliinsaturado y puede incluir radicales di- y multivalentes, teniendo el número de átomos de carbono designado (es decir, C_1-C_{10} significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen, pero sin limitación, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero sin limitación, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros mayores. El término "alquilo", a menos que se indique otra cosa, también pretende incluir los derivados de alquilo definidos en más detalle a continuación, tales como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos hidrocarburo se denominan "homoalquilo".

El término "alquilenos", solo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente obtenido a partir de un alcano, como se ilustra, pero sin limitación, por las estructuras $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, e incluye adicionalmente los grupos descritos a continuación como "heteroalquilenos". Típicamente, un grupo alquilo (o alquilenos) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, teniendo los grupos 10 o menos átomos de carbono que son una realización particular de los procedimientos y composiciones que se describen en el presente documento. Un "alquilo inferior" o "alquilenos inferior" es un grupo alquilo o alquilenos de cadena más corta, que tiene generalmente ocho o menos átomos de carbono.

Las expresiones "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

El término "heteroalquilo", solo o junto con otro término, se refiere, a menos que se indique otra cosa, a un radical hidrocarburo estable de cadena lineal o ramificada o cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado entre el grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los heteroátomos O, N y S y Si pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{H}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. De forma análoga, el término "heteroalquilenos", solo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente obtenido a partir de heteroalquilo, como se ilustra, pero sin limitación, por $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. Para los grupos heteroalquilenos, los mismos o diferentes heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos de la cadena (incluyendo, pero sin limitación, alquilenooxi, alquilenodioxo, alquilenooamino, alquilenodiamino, aminoalquilenos, y similares). Aún adicionalmente, para los grupos de unión alquilenos y heteroalquilenos, ninguna orientación del grupo de unión está implicada por la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ representa tanto $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ como $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$.

Las expresiones "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", solas o junto con otros términos, representan, a menos que se indique otra cosa, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Por lo tanto, un cicloalquilo o un heterocicloalquilo incluyen uniones de anillos saturados, parcialmente insaturados y completamente insaturados.

Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero sin limitación, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidro-tien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares. Además, el término incluye estructuras de anillos bicíclicos y tricíclicos. De forma análoga, el término "heterocicloalquileno", solo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente obtenido a partir de heterocicloalquilo, y el término "cicloalquileno", solo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente obtenido a partir de cicloalquilo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que sea soluble en disolventes acuosos. El enlace de polímeros solubles en agua con polipéptidos de FGF-21 puede dar como resultado cambios que incluyen, pero sin limitación, una semivida en suero aumentada o modulada, o una semivida terapéutica aumentada o modulada en relación con la forma no modificada, inmunogenicidad modulada, características de asociación física moduladas tales como agregación y formación de multímeros, unión al receptor alterada, unión alterada con uno o más compañeros de unión y dimerización o multimerización del receptor alterada. El polímero soluble en agua puede tener o no su propia actividad biológica, y puede utilizarse como un engarce para unir el FGF-21 con otras sustancias incluyendo, pero sin limitación, uno o más polipéptidos de FGF-21, o una o más moléculas biológicamente activas. Los polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol, propionaldehído de polietilenglicol, derivados de monoalcoxi C1-C10 o ariloxi de los mismos (descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.252.714), monometoxipolietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, anhídrido diviniléter maleico, N-(2-Hidroxiopropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano incluyendo sulfato de dextrano, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioli polioxiethylado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de celulosa incluyendo, pero sin limitación, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados del mismo, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, polivinil etil éteres y alfa-beta-poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida, y similares, o mezclas de los mismos. Los ejemplos de tales polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol y albúmina de suero.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polialquilenglicol" o "poli(alquenglicol)" se refiere a polietilenglicol (poli(etilenglicol)), polipropilenglicol, polibutilenglicol y derivados de los mismos. La expresión "polialquilenglicol" abarca polímeros tanto lineales como ramificados y pesos moleculares medios de entre 0,1 kDa y 100 kDa. Otras realizaciones ejemplares se enumeran, por ejemplo, en catálogos comerciales de los proveedores tales como el catálogo de Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001).

El término "arilo" se refiere, a menos que se indique otra cosa, a un sustituyente hidrocarburo poliinsaturado y aromático que puede ser un anillo sencillo o anillos múltiples (incluyendo, pero sin limitación, de 1 a 3 anillos) que están condensados o unidos covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en el que los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y el átomo o los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo que se han indicado anteriormente se seleccionan entre el grupo de sustituyentes aceptables que se describe a continuación.

Para mayor brevedad, el término "arilo", cuando se usa junto con otros términos (incluyendo, pero sin limitación, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye tanto anillos arilo como heteroarilo como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (incluyendo, pero sin limitación, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares), incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (incluyendo, pero sin limitación, un grupo metileno) se ha reemplazado por, por ejemplo, un átomo de oxígeno (incluyendo, pero sin limitación, fenoximetilo, 2-piridiloximatilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los términos anteriores (incluyendo, pero sin limitación, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretende incluir tanto formas sustituidas como sin sustituir del radical indicado. A continuación se proporcionan los sustituyentes ejemplares para cada tipo de radical.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos denominados a menudo como alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) pueden ser uno o más de una diversidad de grupos seleccionados entre, pero sin limitación: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -

S(O)₂NR'R", -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número que varía de cero a (2m'+1), en la que m' es el número total de átomos de carbono en un radical de este tipo. Cada uno de R', R", R''' y R'''' se refiere independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, incluyendo, pero sin limitación, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi o grupos tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como son cada grupo R', R", R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" pretende incluir, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir del análisis de sustituyentes anterior, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo, pero sin limitación, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (incluyendo, pero sin limitación, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

De forma similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo varían y se seleccionan entre, pero sin limitación: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R", -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoroalcoxi (C₁-C₄) y fluoroalquilo (C₁-C₄), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromático; y en los que R', R", R''' y R'''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como son cada uno de los grupos R', R", R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "semivida en suero modulada" significa el cambio positivo o negativo en la semivida en circulación de un FGF-21 modificado con respecto a su forma no modificada. La semivida en suero se mide tomando muestras sanguíneas en diversos puntos temporales después de la administración de FGF-21, y determinando la concentración de esa molécula en cada muestra. La correlación de la concentración en suero con el tiempo permite el cálculo de la semivida en suero. El aumento de la semivida en suero idealmente es de al menos aproximadamente dos veces, pero puede ser útil un aumento más pequeño, por ejemplo cuando permite un régimen de dosificación satisfactorio o evita un efecto tóxico. En algunas realizaciones, el aumento es de al menos aproximadamente tres veces, al menos aproximadamente cinco veces o al menos aproximadamente diez veces.

La expresión "semivida terapéutica modulada" como se usa en el presente documento significa el cambio positivo o negativo en la semivida de la cantidad terapéuticamente eficaz de FGF-21, con respecto a su forma no modificada. La semivida terapéutica se mide midiendo las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de la molécula en diversos puntos temporales después de la administración. La semivida terapéutica aumentada idealmente permite un régimen de dosificación beneficioso particular, una dosis total beneficiosa particular, o evita un efecto no deseado. En algunas realizaciones, la semivida terapéutica aumentada resulta de potencia aumentada; unión reducida o aumentada de la molécula modificada con su diana, rotura aumentada o reducida de la molécula por enzimas tales como proteasas, o un aumento o reducción en otro parámetro o mecanismos de acción de la molécula no modificada o un aumento o reducción de la eliminación mediada por receptor de la molécula.

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o proteína está sin al menos algunos de los componentes celulares con los que está asociado en el estado natural, o que el ácido nucleico o proteína se ha concentrado a un nivel mayor que la concentración de su producción *in vivo* o *in vitro*. Puede estar en un estado homogéneo. Las sustancias aisladas pueden estar en un estado seco o semiseco, o en solución, incluyendo, pero sin limitación, una solución acuosa. Puede ser un componente de una composición farmacéutica que comprende vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa de las fases de lectura abiertas que flanquean el gen y codifica una proteína distinta de la del gen de interés. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o proteína da lugar a sustancialmente una banda en un gel electroforético. Particularmente, puede significar que el ácido nucleico o proteína es puro en al menos un 85%, es puro en al menos un 90%, es puro en al menos un 95%, es puro en al menos un 99% o más.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono- o bicatenaria. A no ser que se limite de forma específica, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de origen natural. A no ser que se limite específicamente de otro modo, la expresión también se refiere a análogos de oligonucleótidos que incluyen ANP (ácido nucleico peptídico), análogos de ADN usados en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos y similares). A no ser que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de la misma (incluyendo, pero sin limitación, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, pueden conseguirse sustituciones de codones degenerados

generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer y col., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka y col., *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); Rossolini y col., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)).

5 Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y una descripción de una proteína y viceversa. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos de origen natural así como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un aminoácido no codificado de forma natural. Como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en las que los restos de aminoácidos se unen por enlaces peptídicos covalentes.

10 El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y origen no natural, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos codificados de forma natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirrolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tal como homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (tales como, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. La referencia a un aminoácido incluye, por ejemplo, L-aminoácidos proteogénicos de origen natural; D-aminoácidos, aminoácidos modificados químicamente tales como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos de origen natural tales como β -alanina, ornitina, etc.; y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades que se conocen en la materia que son características de los aminoácidos. Los ejemplos de aminoácidos de origen no natural incluyen, pero sin limitación, α -metil aminoácidos (por ejemplo, α -metil alanina), D-aminoácidos, aminoácidos de tipo histidina (por ejemplo, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina y α -metilhistidina), aminoácidos que tienen un metileno extra en la cadena lateral (“homo” aminoácidos) y aminoácidos en los que un grupo funcional de ácido carboxílico en la cadena lateral se ha reemplazado con un grupo de ácido sulfónico (por ejemplo, ácido cisteico).

20 Puede hacerse referencia a los aminoácidos en el presente documento por sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Puede hacerse referencia a los nucleótidos, de forma similar, por sus códigos de una letra habitualmente aceptados.

25 “Variantes modificadas de forma conservativa” se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, “variantes modificadas de forma conservativa” se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran variedad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican, todos ellos, el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina se especifica por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto habitual en la materia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina y TGG que es habitualmente el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

30 Con respecto a las secuencias de aminoácidos, un experto habitual en la materia reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales en un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia proteica que alteren, añadan o supriman un solo aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada son “variantes modificadas de forma conservativa” cuando la alteración da como resultado la deleción de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Se conocen por los expertos habituales en la materia tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Tales variantes modificadas de forma conservativa son además de y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos entre especies, y alelos de la invención.

35 Se conocen por los expertos habituales en la materia tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 40 1) Alanina (A), Glicina (G);
2) Ácido aspártico (D), ácido Glutámico (E);
3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

- 4) Arginina (R), Lisina (K);
 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
 7) Serina (S), Treonina (T); y
 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2ª edición (diciembre de 1993).

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son “sustancialmente idénticas” si tienen un porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente 60% de identidad, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% o aproximadamente 95% de identidad sobre una región específica), cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias (u otros algoritmos disponibles para personas expertas en la materia) o por alineamiento manual e inspección visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de ensayo. La identidad puede existir sobre una región que es de al menos aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o sobre una región que es de 75-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud o, cuando no se especifica, a lo largo de la secuencia completa de un polinucleótido o polipéptido. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos de especies distintas del ser humano, puede obtenerse por un procedimiento que comprende las etapas de explorar una biblioteca en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada que tiene una secuencia polinucleotídica de la invención o un fragmento de la misma, y aislar clones de ADNc de longitud completa y genómicos que contienen dicha secuencia polinucleotídica. Tales técnicas de hibridación se conocen por el experto en la materia.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de ensayo y referencia en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmos de secuencia. Pueden usarse los parámetros del programa por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después los porcentajes de identidad de secuencia para la secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, como se usa en el presente documento, incluye referencia a un segmento de una cualquiera de la variedad de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en el que puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de forma óptima. Se conocen procedimientos de alineamiento de secuencias para comparación por los expertos habituales en la materia. Puede realizarse un alineamiento óptimo de secuencias para comparación incluyendo, pero sin limitación, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2: 482c, por el alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444, por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 que se describen en Altschul y col. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, y Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. Está disponible públicamente software para realizar análisis de BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica disponible en Internet en ncbi.nlm.nih.gov. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabras (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M= 5, N= -4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M= 5, N= -4 una comparación de ambas hebras. El algoritmo BLAST se realiza típicamente con el filtro de “complejidad baja” apagado.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma menor (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma menor en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2 o

menor de aproximadamente 0,01, o menor de aproximadamente 0,001.

La frase “hibrida selectivamente (o específicamente) con” se refiere a la unión, formación de doble cadena o hibridación de una molécula solamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (incluyendo, pero sin limitación, ADN o ARN de biblioteca o celular total).

La frase “condiciones de hibridación rigurosas” se refiere a hibridación de secuencias de ADN, ARN, ANP u otros miméticos de ácidos nucleicos, o combinaciones de los mismos en condiciones de baja fuerza iónica y alta temperatura como se conoce en la técnica. Típicamente, en condiciones rigurosas, una sonda hibridará con su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácido nucleico (incluyendo, pero sin limitación, ADN o ARN de biblioteca o celular total) pero no hibrida con otras secuencias en la mezcla compleja. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Se encuentra una guía exhaustiva de la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993). Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas para que estén aproximadamente 5-10 °C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_m es la temperatura (en fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias de la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (puesto que la secuencias dianas están presentes en exceso a T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas pueden ser aquellas en las que la concentración salina es menor de aproximadamente 1,0 M de ión sódico, típicamente una concentración de ión sódico (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es al menos aproximadamente de 30 °C para sondas cortas (incluyendo, pero sin limitación, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (incluyendo, pero sin limitación, mayores de 50 nucleótidos). También pueden conseguirse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos dos veces la hibridación de fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50%, SSC 5X y SDS 1%, incubando a 42 °C, o SSC 5X, SDS 1%, incubando a 65 °C, con lavado en SSC 0,2X y SDS 0,1% a 65 °C. Tales lavados pueden realizarse durante 5, 15, 30, 60, 120 o más minutos.

Como se usa en el presente documento, el término “eucariota” se refiere a organismos que pertenecen al dominio filogenético Eucarya tales como animales (incluyendo, pero sin limitación, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluyendo, pero sin limitación, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas, etc.), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios, prostistas, etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión “no eucariota” se refiere a organismos no eucarióticos. Por ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer al dominio filogenético Eubacteria (incluyendo, pero sin limitación, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, etc.) o el dominio filogenético Archaea (incluyendo, pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* tal como *Haloferax volcanii* y especies de *Halobacterium* NRC-1, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix*, etc.).

El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, en algunas realizaciones de la divulgación un mamífero, y en otras realizaciones un ser humano, que es el objeto del tratamiento, observación o experimento. Un animal puede ser un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos y similares), animal de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) o un animal de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas y similares).

La expresión “cantidad eficaz”, como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad del polipéptido de aminoácidos no naturales modificados que se administra, que aliviará en cierto grado uno o más de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno que se trate. Las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales modificado descrito en el presente documento pueden administrarse para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos.

Los términos “potenciar” o “potenciador” significan que se aumenta o prolonga en potencia o duración un efecto deseado. Por lo tanto, con respecto a potenciar el efecto de agentes terapéuticos, el término “potenciador” se refiere a la capacidad para aumentar o prolongar, en potencia o duración, el efecto de otros agentes terapéuticos en un sistema. Una “cantidad potenciadora eficaz”, como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad adecuada para potenciar el efecto de otro agente terapéutico en un sistema deseado. Cuando se usa en un paciente, las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y curso de la enfermedad, trastorno o afección, terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el criterio del médico que realiza el tratamiento.

El término “modificado”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cambio realizado en un polipéptido dado, tal como cambios en la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, la estructura

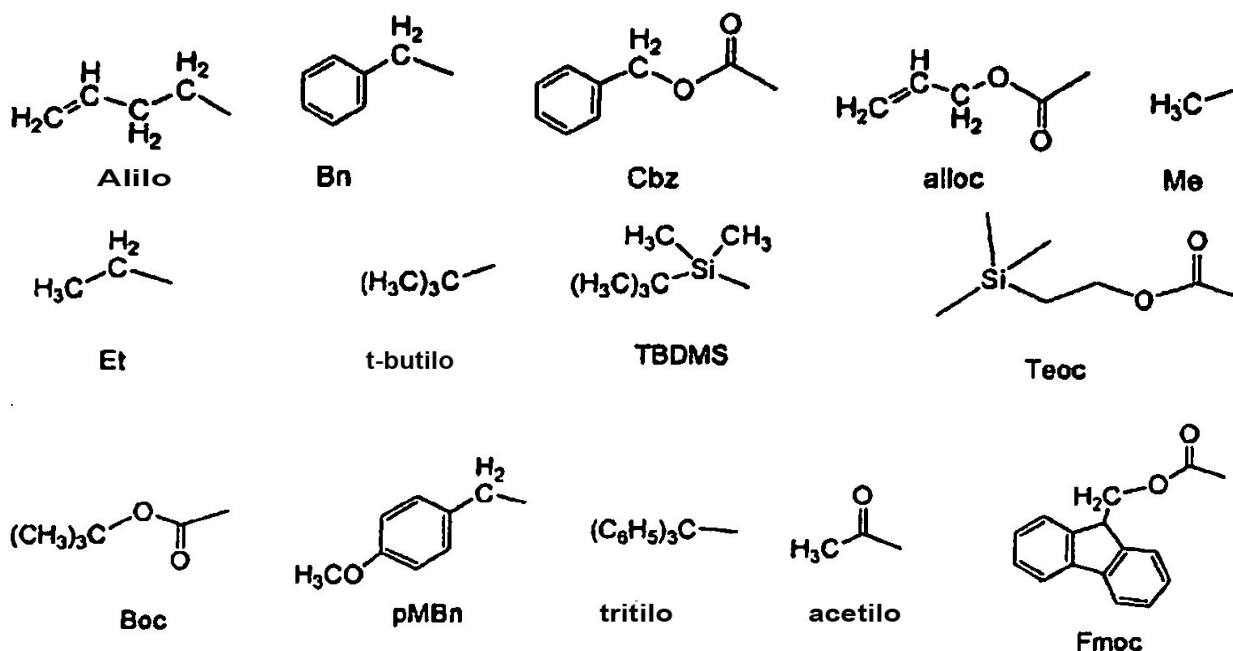
química, modificación co-traduccional o modificación postraduccional de un polipéptido. El término de forma “(modificada)” significa que los polipéptidos que se analizan están opcionalmente modificados, es decir, los polipéptidos que se analizan pueden estar modificados o no modificados.

5 La expresión “modificado postraduccionalmente” se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce en dicho aminoácido después de que se haya incorporado en una cadena polipeptídica. La expresión abarca, solamente como ejemplo, modificaciones cotraduccionales *in vivo*, modificaciones cotraduccionales *in vitro* (tales como en un sistema de traducción sin células), modificaciones postraduccionales *in vivo* y modificaciones postraduccionales *in vitro*.

10 En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones que contienen el polipéptido de FGF-21 a un paciente susceptible de o en riesgo de otro modo de padecer una enfermedad, trastorno o afección particular. Se define que dicha cantidad es una “cantidad profilácticamente eficaz”. En este uso, las cantidades precisas también dependen del estado de salud del paciente, peso y similares. Se considera que está dentro de la experiencia de la técnica determinar tales cantidades profilácticamente eficaces por experimentación rutinaria (por ejemplo, un ensayo clínico de aumento de dosis).

15 El término “protegido” se refiere a la presencia de un “grupo protector” o resto que evita la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se proteja. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse del grupo de *terc*-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo o *terc*-butilo. También pueden usarse otros grupos protectores conocidos en la técnica en o con los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento, incluyendo grupos fotolábiles tales como Nvoc y MeNvoc. Otros grupos protectores conocidos en la técnica también pueden usarse en o con los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento.

Solamente como ejemplo, los grupos de bloqueo/protectores pueden seleccionarse de:



30 Se describen otros grupos protectores en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999.

35 En aplicaciones terapéuticas, las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales modificado se administran a un paciente que ya padece una enfermedad, afección o trastorno, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Se define que dicha cantidad es una “cantidad terapéuticamente eficaz” y dependerá de la gravedad y curso de la enfermedad, trastorno o afección, terapia anterior, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos y el criterio del médico que analiza el tratamiento. Se considera que está dentro de la experiencia de la técnica determinar dichas cantidades terapéuticamente eficaces por experimentación rutinaria (por ejemplo, un ensayo clínico de aumento de dosis).

El término “tratar” se usa para referirse a tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

Los polipéptidos de aminoácidos no codificados de forma natural presentados en el presente documento pueden incluir compuestos marcados con isótopos con uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico encontrado habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , respectivamente. Ciertos compuestos marcados con isótopos descritos en el presente documento, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C , pueden ser útiles en ensayos de distribución tisular de fármacos y/o sustratos. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor semivida *in vivo* o menores requisitos de dosificación.

Todos los isómeros incluyendo diastereómeros, enantiómeros y mezclas de los mismos se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento. En realizaciones adicionales o posteriores, los polipéptidos de aminoácidos no codificados de forma natural se metabolizan tras la administración a un organismo que necesita producir un metabolito que se usa después para producir el efecto deseado, incluyendo un efecto terapéutico deseado. En realizaciones adicionales o posteriores son metabolitos activos de polipéptidos de aminoácidos no codificados de forma natural.

En algunas situaciones, los polipéptidos de aminoácidos no codificados de forma natural pueden existir como tautómeros. Además, los polipéptidos de aminoácidos no codificados de forma natural descritos en el presente documento pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. Las formas solvatadas también se consideran desveladas en el presente documento. Los expertos habituales en la materia reconocerán que algunos de los compuestos en presente documento pueden existir en varias formas tautoméricas. Todas dichas formas tautoméricas se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento.

A no ser que se indique de otro modo, se emplean procedimientos convencionales de espectroscopía de masas, RMN, HPLC, química proteica, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica.

Descripción detallada

I. Introducción

En la invención se proporcionan moléculas de FGF-21 que comprenden un aminoácido no natural. En ciertas realizaciones de la invención, el polipéptido de FGF-21 con un aminoácido no natural incluye al menos una modificación postraduccional que comprende unión de una molécula de un polímero soluble en agua. En una realización de la divulgación, dicha al menos una modificación postraduccional comprende unión de una molécula incluyendo, pero sin limitación; un marcador, un colorante, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, un fotorreticulador, un radionúclido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante metálico, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de spin, un fluoróforo, un resto que contiene metal, un resto radiactivo, un grupo funcional nuevo, un grupo que interacciona covalente o no covalentemente con otras moléculas, un resto fotoliberador (photocaged), un resto excitable por radiación actínica, un resto fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, un resto que incorpora un átomo pesado, un grupo químicamente escindible, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente activo redox, un amino tioácido, un resto tóxico, un resto marcado con isótopos, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un grupo de intercalación, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un radionucleótido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable, que comprende un segundo grupo reactivo con al menos un aminoácido no natural que comprende un primer grupo reactivo, utilizando metodología química que, como saben los expertos en la materia, es adecuada para los grupos reactivos particulares. Por ejemplo, el primer grupo reactivo es un resto alquililo (incluyendo, pero sin limitación, en el aminoácido no natural *p*-propargiloxifenilalanina, en el que el grupo propargilo también se denomina en ocasiones resto acetileno) y el segundo grupo reactivo es un resto azido, y se utilizan metodologías químicas de cicloadición [3+2]. En otro ejemplo, el primer grupo reactivo es el resto azido (incluyendo, pero sin limitación, el aminoácido no natural *p*-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es el resto alquililo. En ciertas realizaciones del polipéptido de FGF-21 modificado de la presente invención, se usa al menos un aminoácido no natural (incluyendo, pero sin limitación, aminoácido no natural que contiene un grupo funcional ceto) que comprende al menos una modificación postraduccional, en el que al menos una modificación postraduccional comprende un resto de sacárido. En ciertas realizaciones, la modificación postraduccional se realiza *in vivo* en una célula eucariota o en una célula no eucariota. Un engarce, polímero, polímero soluble en agua u otra

molécula pueden unir la molécula al polipéptido. La molécula puede ligarse directamente al polipéptido.

En ciertas realizaciones, la proteína incluye al menos una modificación postraducciona que se realiza *in vivo* por una célula huésped, en la que la modificación postraducciona no se realiza normalmente por otro tipo de célula huésped. En ciertas realizaciones, la proteína incluye al menos una modificación postraducciona que se realiza *in vivo* por una célula eucariota, en la que la modificación postraducciona normalmente no se realiza por una célula no eucariota. Los ejemplos de modificaciones postraduccionales incluyen, pero sin limitación, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de unión de glicolípidos y similares. En una realización, la modificación postraducciona comprende unión de un oligosacárido a una asparagina por un enlace de GlcNAc-asparagina (incluyendo, pero sin limitación, cuando el oligosacárido comprende (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc, y similares). En otra realización, la modificación postraducciona comprende unión de un oligosacárido (incluyendo, pero sin limitación, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por un enlace de GalNAc-serina, GalNAc-treonina, GlcNAc-serina o GlcNAc-treonina. En ciertas realizaciones, una proteína o polipéptido de la invención puede comprender una secuencia de secreción o localización, un marcador epitópico, un marcador FLAG, un marcador de polihistidina, una fusión GST y/o similares. Los ejemplos de secuencias señal de secreción incluyen, pero sin limitación, una secuencia señal de secreción procariota, una secuencia señal de secreción eucariota, una secuencia señal de secreción eucariota optimizada en 5' para expresión bacteriana, una secuencia señal de secreción nueva, una secuencia señal de secreción de pectato liasa, secuencia señal de secreción de Omp A y una secuencia señal de secreción de fagos. Los ejemplos de secuencias señal de secreción incluyen, pero sin limitación, STII (procariota), Fd GIII y M13 (fago), Bgl2 (levadura) y la secuencia señal bla derivada de un transposón. Cualquiera de estas secuencias puede modificarse para proporcionar un resultado deseado con el polipéptido incluyendo, pero sin limitación, sustituyendo una secuencia señal con una secuencia señal diferente, sustituyendo una secuencia líder con una secuencia líder diferente, etc.

La proteína o polipéptido de interés contiene un aminoácido no natural. Un aminoácido particular presente en una versión de origen natural de la proteína se sustituye con un aminoácido no natural.

La presente invención proporciona procedimientos y composiciones basados en FGF-21 que comprenden un aminoácido no codificado de forma natural. La introducción de un aminoácido no codificado de forma natural en FGF-21 puede permitir la aplicación de químicas de conjugación que implican reacciones químicas específicas incluyendo, pero sin limitación, con un aminoácido no codificado de forma natural sin reaccionar a la vez con los 20 aminoácidos habituales. En algunas realizaciones, FGF-21 que comprende el aminoácido no codificado de forma natural se une a un polímero soluble en agua, tal como polietilenglicol (PEG), a través de la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural. La presente invención proporciona un procedimiento altamente eficaz para la modificación selectiva de proteínas con derivados de PEG, que implica la incorporación selectiva de aminoácidos no codificados genéticamente incluyendo, pero sin limitación, los aminoácidos que contienen grupos funcionales o sustituyentes no encontrados en los 20 aminoácidos incorporados de forma natural incluyendo, pero sin limitación, una cetona, un resto azida o acetileno, en proteínas en respuesta a un codón selector y la modificación posterior de esos aminoácidos con un derivado de PEG reactivo de forma adecuada. Una vez incorporadas, las cadenas laterales de aminoácidos pueden modificarse después utilizando metodologías químicas que se sabe por los expertos habituales en la materia que son adecuadas para los grupos funcionales particulares o sustituyentes presentes en el aminoácido no codificado de forma natural. Las metodologías químicas conocidas de una amplia diversidad son adecuadas para su uso en la presente invención para incorporar un polímero soluble en agua en la proteína. Dichas metodologías incluyen, pero sin limitación, una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] (véase, por ejemplo Padwa, A. en *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; y, Huisgen, R. en *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, Nueva York, p. 1-176) con, incluyendo pero sin limitación, derivados de acetileno o azida, respectivamente.

Debido a que el procedimiento de cicloadición de Huisgen [3+2] implica una cicloadición en lugar de una reacción de sustitución nucleófila, las proteínas pueden modificarse con selectividad extremadamente alta. La reacción puede llevarse a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas con una excelente regioselectividad (1,4 > 1,5) mediante la adición de cantidades catalíticas de sales de Cu(I) a la mezcla de reacción. Véase, por ejemplo, Tornøe, y col., (2002) *J. Org. Chem.* 67: 3057-3064; y, Rostovtsev, y col., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 2596-2599; y el documento WO 03/101972. Una molécula que puede añadirse a una proteína de la invención a través de una cicloadición [3+2] incluye prácticamente cualquier molécula con un grupo funcional adecuado o sustituyente que incluye, pero sin limitación, un derivado de azido o acetileno. Estas moléculas pueden añadirse a un aminoácido no natural con un grupo acetileno incluyendo, pero sin limitación, *p*-propargiloxifenilalanina, o grupo azido incluyendo, pero sin limitación, *p*-azido-fenilalanina, respectivamente.

El anillo de cinco miembros que resulta de la cicloadición de Huisgen [3+2] generalmente no es reversible en ambientes reductores y es estable contra la hidrólisis durante periodos prolongados en ambientes acuosos. En consecuencia, las características físicas y químicas de una amplia diversidad de sustancias pueden modificarse en condiciones acuosas exigentes con los derivados de PEG activos de la presente invención. Resulta aún más importante que, debido a que los restos azida y acetileno son específicos entre sí (y no reaccionan, por ejemplo, con ninguno de los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente), las proteínas pueden modificarse en uno o más sitios específicos con selectividad extremadamente alta.

La invención también proporciona derivados solubles en agua e hidrolíticamente estables de derivados de PEG y polímeros hidrófilos relacionados que tienen uno o más restos acetileno o azida. Los derivados de polímero PEG que contienen restos acetileno son altamente selectivos para el acoplamiento con restos azida que se han introducido selectivamente en proteínas en respuesta a un codón selector. De forma similar, los derivados de polímero PEG que contienen restos azida son altamente selectivos para el acoplamiento con restos acetileno que se han introducido de forma selectiva en proteínas en respuesta a un codón selector.

Más específicamente, los restos azida comprenden, pero sin limitación, alquilazidas, arilazidas y derivados de estas azidas. Los derivados de las alquil y aril azidas pueden incluir otros sustituyentes siempre que se mantenga la reactividad específica de acetileno. Los restos acetileno comprenden alquil y aril acetilenos y derivados de cada uno. Los derivados de los alquil y aril acetilenos pueden incluir otros sustituyentes siempre que se mantenga la reactividad específica de azida.

La presente invención proporciona conjugados de sustancias que tienen una amplia diversidad de grupos funcionales, sustituyentes o restos, incluyendo otras sustancias un polímero soluble en agua. También se desvelan conjugados con, pero sin limitación, un marcador; un colorante; un polímero; un derivado de polietilenglicol; un fotoreticulador; un radionúclido; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante metálico; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un dendrímero soluble en agua; una ciclodextrina; un ácido ribonucleico inhibidor; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de spin; un fluoróforo, un resto que contiene metal; un resto radiactivo; un grupo funcional nuevo; un grupo que interacciona covalente o no covalentemente con otras moléculas, un resto fotoliberador; un resto excitable por radiación actínica; un resto fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; un resto que incorpora un átomo pesado; un grupo escindible químicamente; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente activo redox; un amino tioácido; un resto tóxico; un resto marcado con isótopos; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrodenso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; una molécula pequeña; un punto cuántico; un nanotransmisor; un radionucleótido; un radiotransmisor; un agente de captura de neutrones o cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otro compuesto o sustancia deseable. La presente invención también incluye conjugados de sustancias que tienen restos azida o acetileno con derivados de polímero PEG que tienen los restos acetileno o azida correspondientes. Por ejemplo, un polímero PEG que contiene un resto azida puede acoplarse a una molécula biológicamente activa en una posición en la proteína que contiene un aminoácido no codificado genéticamente que porta una funcionalidad de acetileno. El enlace por el que el PEG y la molécula biológicamente activa se acoplan incluye, pero sin limitación el producto de cicloadición de Huisgen [3+2].

Se ha establecido bien en la técnica que PEG puede usarse para modificar las superficies de biomateriales (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.610.281; Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci., 3(1): 125-136 (2000)). La divulgación también incluye biomateriales que comprenden una superficie que tiene uno o más sitios de azida o acetileno reactivos y uno o más de los polímeros que contienen azida o acetileno de la invención acoplados a la superficie mediante el enlace de cicloadición de Huisgen [3+2]. Los biomateriales y otras sustancias también pueden acoplarse a los derivados de polímero activados con azida o acetileno a través de un enlace distinto del enlace de azida o acetileno, tal como a través de un enlace que comprende un resto de ácido carboxílico, amina, alcohol o tior, para dejar el resto azida o acetileno disponible para reacciones posteriores.

La divulgación incluye un procedimiento para sintetizar los polímeros que contienen azida o acetileno de la invención. En el caso del derivado de PEG que contiene azida, la azida puede unirse directamente a un átomo de carbono del polímero. Como alternativa, el derivado de PEG que contiene azida puede prepararse uniendo un agente de unión que tiene el resto azida en un extremo con un polímero activado convencional de modo que el polímero resultante tenga el resto azida en su extremo. En el caso del derivado de PEG que contiene acetileno, el acetileno puede unirse directamente con un átomo de carbono del polímero. Como alternativa, el derivado de PEG que contiene acetileno puede prepararse uniendo un agente de unión que tiene el resto acetileno en un extremo con un polímero activado convencional de modo que el polímero resultante tenga el resto acetileno en su extremo.

Más específicamente, en el caso del derivado de PEG que contiene azida, un polímero soluble en agua que tiene al menos un resto hidroxilo activo experimenta una reacción para producir un polímero sustituido que tiene un resto más reactivo, tal como un mesilato, tresilato, tosilato o grupo saliente de halógeno, en el mismo. Los expertos habituales en la materia conocen la preparación y uso de derivados de PEG que contienen haluros de ácido de sulfonilo, átomos de halógeno y otros grupos salientes. El polímero sustituido resultante experimenta después una reacción para sustituir el resto más reactivo con un resto azida en el extremo del polímero. Como alternativa, un polímero soluble en agua que tiene al menos un resto nucleófilo o electrófilo activo experimenta una reacción con un agente de unión que tiene una azida en un extremo de modo que se forme un enlace covalente entre el polímero de PEG y el agente de unión y el resto de azida se sitúe en el extremo del polímero. Se conocen por los expertos habituales en la materia restos nucleófilos y electrófilos, incluyendo aminas, tioles, hidrazidas, hidrazinas, alcoholes, carboxilatos, aldehídos, cetonas, tioésteres y similares.

Más específicamente, en el caso del derivado de PEG que contiene acetileno, un polímero soluble en agua que tiene al menos un resto hidroxilo activo experimenta una reacción para desplazar un halógeno u otro grupo saliente activado de un precursor que contiene un resto acetileno. Como alternativa, un polímero soluble en agua que tiene al menos un resto nucleófilo o electrófilo activo experimenta una reacción con un agente de unión que tiene un acetileno en un extremo de modo que se forme un enlace covalente entre el polímero de PEG y el agente de unión y el resto acetileno se posicione en el extremo del polímero. El uso de restos de halógeno, grupo saliente activado, restos nucleófilos y neutrófilos en el contexto de la síntesis orgánica y la preparación y uso de derivados de PEG está bien establecido para los facultativos de la materia.

La divulgación también proporciona un procedimiento para la modificación selectiva de proteínas para añadir otras sustancias a la proteína modificada incluyendo, pero sin limitación, polímeros solubles en agua tales como PEG y derivados de PEG que contienen un resto azida o acetileno. Los derivados de PEG que contienen azida y acetileno pueden usarse para modificar las propiedades de superficies y moléculas en las que la biocompatibilidad, estabilidad, solubilidad y falta de inmunogenicidad son importantes, proporcionado al mismo tiempo un medio más selectivo para unir los derivados de PEG a las proteínas de lo que se conocía previamente en la técnica.

II. Factor de crecimiento de fibroblastos

Debido a sus potentes actividades para promover el crecimiento, proliferación, supervivencia y diferenciación de una amplia diversidad de células y tipos tisulares, los FGF continúan investigándose como agentes terapéuticos para varias indicaciones diferentes, incluyendo curación de heridas, tales como afecciones musculoesqueléticas, por ejemplo, fracturas de huesos, reparación de tejidos y ligamentos, tendinitis, bursitis, etc.; afecciones cutáneas, por ejemplo, quemaduras, cortes, laceraciones, úlceras por presión, úlceras de curación lenta, etc.; protección tisular, reparación y la inducción de angiogénesis durante un infarto de miocardio e isquemia, en el tratamiento de afecciones neurológicas, por ejemplo, enfermedad neurodegenerativa y apoplejía, en el tratamiento de enfermedad ocular, incluyendo degeneración macular y similares.

Las proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) inidentificadas hasta la fecha pertenecen a una familia de moléculas de señalización que regulan el crecimiento y diferenciación de una diversidad de tipos celulares. La importancia de las proteínas de FGF para la fisiología y patología humanas se relaciona en parte con sus papeles clave en embriogénesis, en el desarrollo y crecimiento de vasos sanguíneos y en el crecimiento óseo. Los experimentos *in vitro* han demostrado un papel para FGF en la regulación del crecimiento celular y división de células endoteliales, células de músculo liso vascular, fibroblastos y miocitos cardiacos y esqueléticos. Otros miembros de la familia de FGF y sus papeles biológicos se describen en Crossley y col., *Development* 121: 439-451 (1995); Ohuchi y col., *Development* 124: 2235-2244 (1997); Gemel y col., *Genomics* 35: 253-257 (1996); y Ghosh y col., *Cell Growth and Differentiation* 7: 1425-1434 (1996).

Las proteínas de FGF también son importantes para la enfermedad y salud humana debido a un papel en el crecimiento de células cancerosas. Por ejemplo, FGF-8 se identificó como un factor de crecimiento inducido por andrógenos en células de cáncer de próstata y de mama (Tanaka y col., *FEBS Lett.* 363: 226-230 (1995) y P.N.A.S. 89: 8928-8932 (1992)).

El papel de FGF en el desarrollo normal se está elucidando en parte a través de estudios de receptores de FGF. Wilke, T. y col., *Dev. Dynam.* 210: 41-52 (1997) descubrieron que los transcritos de FGFR1, FGFR2 y FGFR3 se localizaban en regiones específicas de la cabeza durante el desarrollo embrionario en pollos. El patrón de expresión se correlacionó con áreas afectadas por mutaciones de FGFR humano en el síndrome de Crouzon, una afección de formación de hueso intramembranoso anómala. Belluardo, N. y col., *Jour. Comp. Neur.* 379: 226-246 (1997) estudiaron la localización de ARNm de FGFR 1, 2 y 3 en cerebro de rata, y descubrieron especificidad celular en varias regiones del cerebro. Además, se expresaron ARNm de FGFR1 y FGFR2 en células reactivas astrogliales después de una lesión cerebral, lo que apoya un papel de ciertos FGF en la enfermedad y lesión cerebral. Ozawa, K. y col., *Mol. Brain Res.* 41: 279-288 (1996) indicaron que la expresión de FGF-1 y FGF-5 aumentaba después del nacimiento, mientras que los genes de FGF-3, FGF-6, FGF-7 y FGF-8 mostraban una expresión más alta en etapas embrionarias tardías que en etapas postnatales. Un cofactor, Klotho beta (K1b), también puede estar implicado en la transducción de señales de FGF-21 y su receptor. Se ha indicado que K1b aumenta la capacidad de FGFR1 y FGFR4 para unirse a FGF21. K1b es una proteína transmembrana de paso sencillo y aunque se desconoce el papel de la forma transmembrana completa, se ha mostrado con respecto a FGF23 que Klotho potenciaba la unión de FGF23 y aumentaba la fosforilación del receptor de FGF mientras que se ha mostrado que Klotho beta potencia la unión de FGF-21 (H. Kurosu, Y. Ogawa, M. Miyoshi, M. Yamamoto, A. Nandi, K. P. Rosenblatt, M. G. Baum, S. Schiavi, M.-C. Hu, O. W. Moe, M. Kuro-o, Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *J. Biol. Chem.* 281, 6120-6123 (2006)).

Katoh y col. (*International Journal of Oncology* (2006) 29: 163-168) describen la familia de FGF y análisis filogenéticos de los miembros de la familia. Katoh y col. También analizan la red de rutas de señalización en el tracto gastrointestinal.

Plotnikov y col. (*Cell* (1999) 98: 641-650) describen la estructura cristalina de FGF2 con el receptor de FGF 1 (FGFR1) y el dímero simétrico doble que se forma entre dos de estos complejos. Plotnikov y col. proporcionan un

modelo de dimerización del receptor e inducción de dimerización por FGF y heparina.

Es probable que se descubran en el futuro miembros adicionales de la familia de FGF. Pueden identificarse nuevos miembros de la familia de FGF mediante el análisis de estructuras secundarias y terciarias asistido por ordenador de las secuencias proteicas predichas, y por técnicas de selección diseñadas para identificar moléculas que se unen a una diana particular.

Por lo tanto, la descripción de la familia de FGF se proporciona para fines ilustrativos y solamente como ejemplo y no como límite del alcance de los procedimientos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en el presente documento. Además, la referencia a FGF-21 en la presente solicitud pretende usar el término genérico como ejemplo de cualquier miembro de la familia de FGF. Por lo tanto, se entiende que las modificaciones y químicas descritas en el presente documento con referencia a polipéptidos o proteína de FGF-21 pueden aplicarse igualmente a cualquier miembro de la familia de FGF, incluyendo los enumerados específicamente en el presente documento.

III. Procedimientos de ácidos nucleicos recombinantes generales para su uso con la invención

En numerosas realizaciones de la presente divulgación, se aislarán, clonarán y con frecuencia alterarán ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de FGF-21 de interés usando procedimientos recombinantes. Tales realizaciones de la divulgación se usan, incluyendo pero sin limitación, para la expresión de proteínas o durante la generación de variantes, derivados, casetes de expresión u otras secuencias derivadas de un polipéptido de FGF-21. En algunas realizaciones de la divulgación, las secuencias que codifican los polipéptidos de la invención están unidas operativamente a un promotor heterólogo.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de manera natural puede sintetizarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor, incluyendo pero sin limitación, teniendo la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 1-7 y cambiando después la secuencia de nucleótidos para efectuar la introducción (es decir, incorporación o sustitución) o retirada (es decir, delección o sustitución) del resto o los restos de aminoácidos relevantes. La secuencia de nucleótidos puede modificarse convenientemente por mutagénesis dirigida de acuerdo con procedimientos convencionales. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede prepararse por síntesis química, incluyendo pero sin limitación, usando un sintetizador de oligonucleótidos, en el que los oligonucleótidos se diseñan basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado, y preferentemente seleccionando los codones preferidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante. Por ejemplo, pueden sintetizarse varios oligonucleótidos pequeños que codifican partes del polipéptido deseado y ensamblarse por PCR, ligación o reacción en cadena de ligación. Véase, por ejemplo, Barany, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189-193 (1991); Patente de Estados Unidos N° 6.521.427.

La presente invención utiliza técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que desvelan los procedimientos generales de uso en la presente invención incluyen Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds., 1994)).

Los textos generales que describen técnicas de biología molecular incluyen Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook y col., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 ("Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y col., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (complementado hasta 1999) ("Ausubel"). Estos textos describen mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros asuntos relevantes relacionados con, incluyendo pero sin limitación, la generación de genes o polinucleótidos que incluyen codones selectores para producción de proteínas que incluyen aminoácidos no naturales, ARNt ortogonales, sintetetas ortogonales y pares de los mismos.

En la invención se usan diversos tipos de mutagénesis para una diversidad de fines incluyendo, pero sin limitación, producir nuevas sintetetas o ARNt, mutar moléculas de ARNt, mutar polinucleótidos que codifican sintetetas, producir bibliotecas de ARNt, producir bibliotecas de sintetetas, producir codones selectores, insertar codones selectores que codifican aminoácidos no naturales en una proteína o polipéptido de interés. Estos incluyen, pero sin limitación, mutagénesis dirigida, puntual aleatoria, recombinación homóloga, barajado de ADN u otros procedimientos de mutagénesis recursivos, construcción quimérica, mutagénesis usando moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificada por fosforotioato, mutagénesis usando ADN bicatenario con huecos o similares, mutagénesis mediada por PCT o cualquier combinación de los mismos. Los procedimientos adecuados adicionales incluyen reparación de emparejamiento erróneo puntual, mutagénesis usando cepas de huésped deficientes en la reparación, selección de restricción y purificación de restricción, mutagénesis de delección, mutagénesis por síntesis génica total, reparación de rupturas de doble cadena y similares. En la presente invención también se incluye mutagénesis incluyendo, pero sin limitación, la que implica construcciones quiméricas. En una realización, la mutagénesis puede guiarse por información conocida de la molécula de origen natural o molécula de origen natural alterada o mutada incluyendo, pero sin limitación, secuencia, comparaciones de secuencia, propiedades físicas, estructura secundaria, terciaria o cuaternaria,

estructura cristalina o similares.

Los textos y ejemplos hallados en el presente documento describen estos procedimientos. Se encuentra información adicional en las siguientes publicaciones y en las referencias citadas en ellas: Ling y col., Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal Biochem.* 254 (2): 157-178 (1997); Dale y col., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57: 369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.* 19: 423-462 (1985); Botstein y Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science* 229: 1193-1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237: 1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. y Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492 (1985); Kunkel y col., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass y col., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242: 240-245 (1988); Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6500 (1982); Zoller y Smith, Oligonucleotidedirected mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Taylor y col., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor y col., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye y Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers y col., 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16: 791-802 (1988); Sayers y col., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer y col., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Kramer y Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.* 154: 350-367 (1987); Kramer y col., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz y col., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer y col., Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*, *Cell* 38: 879-887 (1984); Carter y col., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh y Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells y col., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar y col., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakmar y Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells y col., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, *Gene* 34: 315-323 (1985); Grundström y col., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandeck, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, *Current Opinion in Biotechnology* 4: 450-455 (1993); Sieber, y col., *Nature Biotechnology*, 19: 456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); y I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995). Pueden encontrarse detalles adicionales de muchos de los procedimientos anteriores en *Methods in Enzymology Volumen 154*, que también describe controles útiles para resolución de problemas con diversos procedimientos de mutagénesis.

Los oligonucleótidos, por ejemplo, para su uso en mutagénesis de la presente invención, por ejemplo, mutación de bibliotecas de sintetasas, o alteración de ARNt, típicamente se sintetizan químicamente de acuerdo con el procedimiento de triéster de fosforamidita de fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20): 1859-1862, (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automático, como se describe en Needham-VanDevanter y col., *Nucleic Acids Res.*, 12: 6159-6168 (1984).

La divulgación también se refiere a células huésped eucariotas, células huésped no eucariotas y organismos para la incorporación *in vivo* de un aminoácido no natural mediante pares de ARNt/RS ortogonales. Las células huésped se modifican por ingeniería genética (incluyendo, pero sin limitación, por transformación, transducción o transfección) con los polinucleótidos de la divulgación o construcciones que incluyen un polinucleótido de la divulgación incluyendo, pero sin limitación, un vector de la divulgación que puede ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. Por ejemplo, las regiones codificantes para el ARNt ortogonal, la ARNt sintetasa ortogonal y la proteína a derivatizar se ligan operativamente a elementos de control de la expresión génica que son funcionales en la célula huésped deseada. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, un cósmido, un fago, una bacteria, un virus, un polinucleótido desnudo o un polinucleótido conjugado. Los vectores se introducen en células y/o microorganismos por procedimientos convencionales incluyendo electroporación (Fromm y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 82, 5824 (1985)), infección por vectores virales, penetración balística de alta velocidad por

partículas pequeñas con el ácido nucleico dentro de la matriz de perlas pequeñas o partículas, o en la superficie (Klein y col., *Nature* 327, 70-73 (1987)), y/o similares.

5 Las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para actividades tales como, por ejemplo, exploración de etapas, activación de
 10 promotores o selección de transformantes. Estas células pueden opcionalmente cultivarse en organismos transgénicos. Otras referencias útiles, incluyendo pero sin limitación para aislamiento y cultivo celular (por ejemplo, para el aislamiento posterior de un ácido nucleico) incluyen Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas en dicho texto; Payne y col. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in liquid Systems* John Wiley y Sons, Inc. Nueva York, NY; Gamburg y Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual*, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg Nueva York) y Atlas y Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

15 Están disponibles varios procedimientos bien conocidos para introducir ácidos nucleicos diana en células, cualquiera de los cuales puede usarse en la divulgación. Estos incluyen: fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, electroporación, bombardeo con proyectiles e infección con vectores virales (analizados adicionalmente posteriormente), etc. Pueden usarse células bacterianas para amplificar el número de plásmidos que contienen construcciones de ADN de la presente divulgación. Las bacterias se cultivan hasta la fase
 20 logarítmica y los plásmidos dentro de las bacterias pueden aislarse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook). Además, están disponibles en el mercado kits para la purificación de plásmidos a partir de bacterias, (véase, por ejemplo, EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™ de Stratagene; y, QIAprep™ de Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados se manipulan adicionalmente después para producir otros plásmidos, se usan para transfectar células o se incorporan en vectores relacionados para infectar organismos. Los vectores típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de inicio de la transcripción y traducción, y promotores útiles para la regulación de la
 25 expresión del ácido nucleico diana particular. Los vectores comprenden opcionalmente casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencia que permite la replicación del casete en eucariotas, o procariotas, o ambos (incluyendo, pero sin limitación, vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas. Los vectores son adecuados para la replicación e integración en procariotas, eucariotas o ambos. Véase, Gillam & Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts, y col., *Nature* 328:731 (1987); Schneider, E., y col., *Protein Expr. Purif.* 6(1):10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (todos mencionados anteriormente). Se proporciona un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para clonación, por ejemplo, por la ATCC, por ejemplo, *The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage* (1992) Gherna y col. (ed) publicado por la ATCC. También se encuentran procedimientos básicos adicionales para secuenciación, clonación y otros aspectos de la biología molecular y consideraciones teóricas subyacentes en Watson y col. (1992)
 30 *Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY*. Además, esencialmente cualquier ácido nucleico (y prácticamente cualquier ácido nucleico marcado, tanto convencional como no convencional) puede pedirse de forma personalizada o convencional en cualquiera de una diversidad de fuentes comerciales, tales como Midland Certified Reagent Company (Midland, TX disponible en Internet en mcr.com), The Great American Gene Company (Ramona, CA disponible en Internet en genco.com), ExpressGen Inc. (Chicago, IL disponible en Internet en expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) y muchas otras.

CODONES SELECTORES

45 Los codones selectores de la invención expanden el marco de codones genéticos de la maquinaria biosintética de proteínas. Por ejemplo, un codón selector incluye, pero sin limitación, un codón de tres bases único, un codón sin sentido, tal como un codón de parada, incluyendo pero sin limitación, un codón ámbar (UAG), un codón ocre, o un codón ópalo (UGA), un codón no natural, un codón de cuatro o más bases, un codón poco común o similares. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la materia que existe un amplio intervalo en el número de codones selectores que pueden introducirse en un gen o polinucleótido deseado incluyendo, pero sin limitación, uno o más, dos o más, tres o más, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más en un polinucleótido sencillo que codifica al menos una parte del polipéptido de FGF-21.

50 En una realización, los procedimientos de la divulgación implican el uso de un codón selector que es un codón de parada para la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales *in vivo*. Por ejemplo, se produce un ARNt-O que reconoce el codón de parada incluyendo, pero sin limitación, UAG, y se aminoacila por una RS-O con un aminoácido no natural deseado. El ARNt-O no se reconoce por las aminoacil-ARNt sintetasas del huésped de origen natural. Puede usarse mutagénesis dirigida convencional para introducir el codón de parada, incluyendo, pero sin
 55 limitación, TAG, en el sitio de interés en un polipéptido de interés. Véase, por ejemplo, Sayers, J.R., y col. (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, 16: 791-802. Cuando la O-RS, ARNt-O y el ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés se combinan *in vivo*, el aminoácido no natural se incorpora en respuesta al codón UAG para proporcionar un polipéptido que contiene el aminoácido no natural en la posición especificada.

60 La incorporación de aminoácidos no naturales *in vivo* puede realizarse sin perturbación significativa de la célula huésped eucariota. Por ejemplo, debido a que la eficacia de supresión del codón UAG depende de la competición

entre el ARNt-O, incluyendo, pero sin limitación, el ARNt supresor ámbar, y un factor de liberación eucariota (incluyendo, pero sin limitación, eRF) (que se une a un codón de parada e inicia la liberación del péptido creciente del ribosoma), la eficacia de supresión puede modularse, incluyendo pero sin limitación, aumentando el nivel de expresión de ARNt-O y/o el ARNt supresor.

- 5 También pueden codificarse aminoácidos no naturales con codones poco comunes. Por ejemplo, cuando la concentración de arginina en una reacción de síntesis de proteína *in vitro* se reduce, el codón de arginina poco común, AGG, ha resultado ser eficaz para la inserción de Ala por un ARNt sintético acilado con alanina. Véase, por ejemplo, Ma y col., *Biochemistry*, 32: 7939 (1993). En este caso, el ARNt sintético compite con el ARNtArg de origen natural, que existe como una especie minoritaria en *Escherichia coli*. Algunos organismos no usan todos los tripletes codónicos. Un codón no asignado AGA en *Micrococcus luteus* se ha utilizado para la inserción de aminoácidos en un extracto de transcripción/traducción *in vitro*. Véase, por ejemplo, Kowal y Oliver, *Nucl. Acid. Res.*, 25: 4685 (1997). Pueden generarse componentes de la presente invención para usar estos codones poco comunes *in vivo*.

- 15 Los codones selectores también comprenden codones extendidos incluyendo, pero sin limitación, codones de cuatro o más bases, tales como codones de cuatro, cinco, seis o más bases. Los ejemplos de codones de cuatro bases incluyen, pero sin limitación, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU y similares. Los ejemplos de codones de cinco bases incluyen, pero sin limitación, AGGAC, CCCC, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC y similares. Una característica de la invención incluye usar codones extendidos basados en supresión de desplazamiento de fase. Pueden insertarse codones de cuatro o más bases incluyendo, pero sin limitación, uno o múltiples aminoácidos no naturales en la misma proteína. Por ejemplo, en presencia de ARNt-O mutados incluyendo, pero sin limitación, un ARNt supresor de desplazamiento de fase especial, con bucles anticodónicos, por ejemplo, con bucles anticodónicos de al menos 8-10 nt, el codón de cuatro o más bases se lee como un solo aminoácido. En otras realizaciones, los bucles anticodónicos pueden descodificar, incluyendo pero sin limitación, al menos un codón de cuatro bases, al menos un codón de cinco bases, al menos un codón de seis bases o más. Puesto que existen 256 posibles codones de cuatro bases, pueden codificarse múltiples aminoácidos no naturales en la misma célula usando un codón de cuatro o más bases. Véase, Anderson y col., (2002) Exploring the Limits of Codón and Anticodón Size, *Chemistry and Biology*, 9: 237-244; Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 307: 755-769.

- 25 Por ejemplo, se han usado codones de cuatro bases para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas usando procedimientos biosintéticos *in vitro*. Véase, por ejemplo, Ma y col., (1993) *Biochemistry*, 32: 7939; y Hohsaka y col., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 34. CGGG y AGGU se usaron para incorporar simultáneamente 2-naftilalanina y un derivado de NBD de lisina en estreptavidina *in vitro* con dos ARNt supresores de desplazamiento de fase químicamente acilados. Véase, por ejemplo, Hohsaka y col., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 12194. En un estudio *in vivo*, Moore y col. examinaron la capacidad de derivados de ARNtLeu con anticodones NCUA para suprimir codones UAGN (N puede ser U, A, G o C) y descubrieron que el cuadruplete UAGA puede descodificarse por un ARNtLeu con un anticodón UCUA con una eficacia del 13 al 26% con poca descodificación en la fase 0 o -1. Véase Moore y col., (2000) *J. Mol. Biol.*, 298: 195. En una realización, pueden usarse codones extendidos basados en codones poco comunes o codones sin sentido en la presente invención, que pueden reducir la lectura en sentido equivocado y la supresión de desplazamiento de fase en otros sitios no deseados.

- 30 Para un sistema dado, un codón selector también puede incluir uno de los codones de tres bases naturales, en los que el sistema endógeno no usa (o usa pocas veces) el codón de base natural. Por ejemplo, esto incluye un sistema sin un ARNt que reconozca el codón de tres bases natural, y/o un sistema en el que el codón de tres bases es un codón poco común.

- 35 Los codones selectores incluyen opcionalmente pares de bases no naturales. Estos pares de bases no naturales expanden adicionalmente el alfabeto genético existente. Un par de bases extra aumenta el número de tripletes codónicos de 64 a 125. Las propiedades de pares de tercera base incluyen emparejamiento de bases estable y selectivo, la incorporación enzimática eficaz en ADN con alta fidelidad por una polimerasa y la extensión de cebador continuada eficaz después de la síntesis del par de bases no naturales naciente. Las descripciones de pares de bases no naturales que pueden adaptarse para procedimientos y composiciones incluyen, por ejemplo, Hirao, y col., (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, *Nature Biotechnology*, 20: 177-182. Véase también, Wu, Y., y col., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124: 14626-14630. Más adelante se enumeran otras publicaciones.

- 40 Para uso *in vivo*, el nucleósido no natural es permeable a membrana y se fosforila para formar el trifosfato correspondiente. Además, la información genética aumentada es estable y no se destruye por enzimas celulares. Los intentos anteriores de Benner y otros aprovecharon los patrones de formación de enlaces de hidrógeno que son diferentes de los de los pares de Watson-Crick canónicos, siendo el ejemplo más notable de ellos el par iso-C:iso-G. Véase, por ejemplo, Switzer y col., (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 8322; y Piccirilli y col., (1990) *Nature*, 343: 33; Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4: 602. Estas bases en general se emparejan de forma errónea en cierto grado con bases naturales y no pueden replicarse de forma enzimática. Kool y colaboradores demostraron que las interacciones de empaquetamiento hidrófobo entre bases pueden reemplazar los enlaces de hidrógeno para dirigir la formación de pares de bases. Véase, Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4: 602; y Guckian y Kool, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2825. En un intento de desarrollar un par de bases no natural que satisfaga todos los

requisitos anteriores, Schultz, Romesberg y colaboradores han sintetizado sistemáticamente y estudiado una serie de bases hidrófobas no naturales. Se ha descubierto que un autopar PICS:PICS es más estable que los pares de bases naturales, y puede incorporarse eficazmente en el ADN por el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (KF). Véase, por ejemplo, McMinn y col., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121: 11585-6; y Ogawa y col., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122: 3274. Un autopar 3MN:3MN puede sintetizarse por KF con eficacia y selectividad suficientes para la función biológica. Véase, por ejemplo, Ogawa y col., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122: 8803. Sin embargo, ambas bases actúan como un terminador de cadena para replicación adicional. Se ha desarrollado recientemente una ADN polimerasa mutante que puede usarse para replicar el autopar de PICS. Además, puede replicarse una autopar 7Al. Véase, por ejemplo, Tae y col., (2001) J. Am. Chem. Soc., 123: 7439. También se ha desarrollado un nuevo par de metalobases, Dipic:Py, que forma un par estable tras su unión con Cu(II). Véase, Meggers y col., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122: 10714. Debido a que los codones extendidos y los codones no naturales son intrínsecamente ortogonales a los codones naturales, los procedimientos de la invención pueden aprovechar esta propiedad para generar ARNt ortogonales para ellos.

También puede usarse un sistema de derivación traduccional para incorporar un aminoácido no natural en un polipéptido deseado. En un sistema de derivación traduccional, se incorpora una secuencia grande en un gen pero no se traduce en proteínas. La secuencia contiene una estructura que actúa como una señal para inducir que el ribosoma salte la secuencia y reanude la traducción cadena debajo de la inserción.

En ciertas realizaciones, la proteína o polipéptido de interés (o parte del mismo) en los procedimientos y/o composiciones de la invención se codifica por un ácido nucleico. Típicamente, el ácido nucleico comprende al menos un codón selector, al menos dos codones selectores, al menos tres codones selectores, al menos cuatro codones selectores, al menos cinco codones selectores, al menos seis codones selectores, al menos siete codones selectores, al menos ocho codones selectores, al menos nueve codones selectores, o diez o más codones selectores.

Los genes que codifican proteínas o polipéptidos de interés pueden mutarse usando procedimientos conocidos por un experto habitual en la materia y que se describen en el presente documento que incluyen, por ejemplo, uno o más codones selectores para la incorporación de un aminoácido no natural. Por ejemplo, un ácido nucleico para una proteína de interés se muta para incluir uno o más codones selectores, lo que posibilita la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales. La invención incluye cualquiera de tales variantes incluyendo, pero sin limitación, versiones mutantes de cualquier proteína, por ejemplo, incluyendo al menos un aminoácido no natural. De forma similar, la divulgación también incluye ácidos nucleicos correspondientes, es decir, cualquier ácido nucleico con uno o más codones selectores que codifiquen uno o más aminoácidos no naturales.

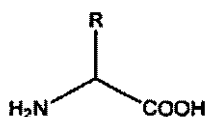
Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de interés tal como un polipéptido de FGF-21 pueden mutarse fácilmente para introducir una cisteína en cualquier posición deseada del polipéptido. La cisteína se usa ampliamente para introducir moléculas reactivas, polímeros solubles en agua, proteínas o una amplia diversidad de otras moléculas, en una proteína de interés. Se conocen por los expertos habituales en la materia procedimientos adecuados para la incorporación de cisteína en una posición deseada de un polipéptido, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.608.183 y técnicas de mutagénesis convencionales.

IV. Aminoácidos No Codificados de Forma Natural

Una diversidad muy amplia de aminoácidos no codificados de forma natural son adecuados para su uso en la presente invención. Puede introducirse cualquier número de aminoácidos no codificados de forma natural en un polipéptido de FGF-21. En general, los aminoácidos no codificados de forma natural introducidos son sustancialmente químicamente inertes para los 20 aminoácidos codificados genéticamente comunes (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina). En algunas realizaciones, los aminoácidos no codificados de forma natural incluyen grupos funcionales de cadenas laterales que reaccionan eficaz y selectivamente con grupos funcionales no encontrados en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitación, grupos azido, cetona, aldehído y aminooxi) para formar conjugados estables. Por ejemplo, un polipéptido de FGF-21 que incluye un aminoácido no codificado de forma natural que contiene un grupo funcional azido puede hacerse reaccionar con un polímero (incluyendo, pero sin limitación, poli(etilenglicol) o, como alternativa, un segundo polipéptido que contiene un resto alquino, para formar un conjugado estable resultante de la reacción selectiva de los grupos funcionales de azida y alquino para formar un producto de cicloadición de Huisgen [3+2].

La estructura genérica de un aminoácido alfa se ilustra como sigue (Fórmula I):

I



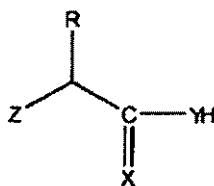
Un aminoácido no codificado de forma natural es típicamente cualquier estructura que tenga la fórmula anteriormente enumerada en la que el grupo R es cualquier sustituyente distinto del usado en los veinte aminoácidos naturales, y puede ser adecuado para su uso en la presente invención. Debido a que los aminoácidos no codificados de forma natural de la invención típicamente difieren de los aminoácidos naturales solamente en la estructura de la cadena lateral, los aminoácidos no codificados de forma natural forman enlaces amida con otros aminoácidos incluyendo, pero sin limitación, naturales o no codificados de forma natural, de la misma manera en la que se forman en polipéptidos de origen natural. Sin embargo, los aminoácidos no codificados de forma natural tienen grupos de cadenas laterales que los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R opcionalmente comprende un grupo alquil-, aril-, acil-, ceto-, azido-, hidroxil-, hidrazina, ciano-, halo-, hidrazida, alqueno, alquino, éter, tiol, seleno-, sulfonil-, borato, boronato, fosfo, fosfona, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino o similares o cualquier combinación de los mismos. Otros aminoácidos de origen no natural de interés que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, aminoácidos que comprenden un agente de reticulación fotoactivable, aminoácidos con marcadores de spin, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos de unión a metales, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos radiactivos, aminoácidos con nuevos grupos funcionales, aminoácidos que interaccionan de forma covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos fotoliberadores y/o fotoisomerizables, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glicosilados tales como una serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con los aminoácidos naturales incluyendo, pero sin limitación, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, incluyendo, pero sin limitación, mayores de aproximadamente cinco o mayores de aproximadamente diez carbonos, aminoácidos que contienen azúcar ligado a carbono, aminoácidos activos para redox, aminoácidos que contienen aminotioácidos, y aminoácidos que comprenden uno o más restos tóxicos.

Los aminoácidos no codificados de forma natural ejemplares que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención y que son útiles para reacciones con polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, los que tienen grupos reactivos de carbonilo, amino, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida y alquino. En algunas realizaciones, los aminoácidos no codificados de forma natural comprenden un resto de sacárido. Los ejemplos de tales aminoácidos incluyen *N*-acetil-L-glucosaminil-L-serina, *N*-acetil-L-galactosaminil-L-serina, *N*-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, *N*-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y *O*-manosaminil-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen ejemplos en los que el enlace N- u O- de origen natural entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente no hallado habitualmente en la naturaleza, incluyendo, pero sin limitación, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran habitualmente en proteínas de origen natural tales como 2-desoxiglucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

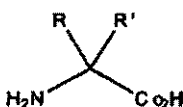
Muchos de los aminoácidos no codificados de forma natural proporcionados en el presente documento están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos), Novabiochem (una división de EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania) o Peptech (Burlington, MA, Estados Unidos). Los que no están disponibles en el mercado se sintetizan opcionalmente como se proporciona en el presente documento o usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos habituales en la materia. En relación con las técnicas de síntesis orgánica véase, por ejemplo, *Organic Chemistry* por Fessenden y Fessenden, (1982, Segunda Edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); *Advanced Organic Chemistry* por March (Tercera Edición, 1985, Wiley y Sons, Nueva York); y *Advanced Organic Chemistry* por Carey y Sundberg (Tercera Edición, Partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Véanse también las Patentes de Estados Unidos N° 7.045.337 y 7.083.970.

Además de aminoácidos no naturales que contienen cadenas laterales nuevas, los aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención también comprenden opcionalmente estructuras de cadena principal modificada, incluyendo pero sin limitación, como se ilustra por las estructuras de Fórmula II y Fórmula III:

II



III



en las que Z típicamente comprende OH, NH₂, SH, NH-R', o S-R'; X e Y, que pueden ser iguales o diferentes, típicamente comprenden S u O y R y R', que son opcionalmente iguales o diferentes, se seleccionan típicamente de la misma lista de constituyentes para el grupo R descrito anteriormente para los aminoácidos no naturales que tienen la Fórmula I así como hidrógeno. Por ejemplo, los aminoácidos no naturales de la invención opcionalmente comprenden sustituciones en el grupo amino o carboxilo como se ilustra por las Fórmulas II y III. Los aminoácidos no naturales de este tipo incluyen, pero sin limitación, α -hidroxiácidos, α -tioácidos, α -aminiocarboxilatos, incluyendo, pero sin limitación, con cadenas laterales correspondientes a los veinte aminoácidos naturales comunes o cadenas laterales no naturales. Además, las sustituciones en el carbono α opcionalmente incluyen, pero sin limitación, aminoácidos L, D o α - α disustituídos tales como D-glutamato, D-alanina, D-metil-O-tirosina, ácido aminobutírico y similares. Otras alternativas estructurales incluyen aminoácidos cíclicos tales como análogos de prolina, así como análogos de prolina de anillo de 3, 4, 6, 7, 8 y 9 miembros, β y γ aminoácidos tales como β -alanina sustituida y ácido γ -aminobutírico.

Muchos aminoácidos no naturales están basados en aminoácidos no naturales tales como tirosina, glutamina, fenilalanina y similares, y son adecuados para su uso en la presente invención. Los análogos de tirosina incluyen, pero sin limitación, tirosinas sustituidas en posición para, tirosinas sustituidas en posición orto y tirosinas sustituidas en posición meta, comprendiendo la tirosina sustituida, incluyendo pero sin limitación, un grupo ceto (incluyendo, pero sin limitación, un grupo acetilo), un grupo benzoilo, un grupo amino, una hidrazina, una hidroxiamina, un grupo tiol, un grupo carboxi, un grupo isopropilo, un grupo metilo, un hidrocarburo C₆ - C₂₀ de cadena lineal o ramificado, un hidrocarburo saturado o insaturado, una grupo O-metilo, un grupo poliéter, un grupo nitro, un grupo alquínico o similares. Además, también se contemplan anillos de arilo con múltiples sustituciones. Los análogos de glutamina que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, derivados de α -hidroxi, derivados γ -sustituídos, derivados cíclicos y derivados de glutamina sustituidos con amida. Los análogos de fenilalanina ejemplares que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, fenilalaninas sustituidas en posición para, fenilalaninas sustituidas en posición orto y fenilalaninas sustituidas en posición meta, en las que el sustituyen comprende, incluyendo pero sin limitación, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo metilo, un grupo alilo, un aldehído, un azido, un yodo, un bromo, un grupo ceto (incluyendo, pero sin limitación, un grupo acetilo), un benzoilo, un grupo alquínico o similares. Los ejemplos específicos de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, ap-acetil-L-fenilalanina, una O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc β -serina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una p-benzoil-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfotirosina, una p-yodo-fenilalanina, una p-bromofenilalanina, una p-amino-L-fenilalanina, una isopropil-L-fenilalanina y una p-propargiloxi-fenilalanina y similares. Se proporcionan ejemplos de estructuras de una diversidad de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuadas para su uso en la presente invención en, por ejemplo, el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids". Véase también Kiick y col., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99: 19-24 para análogos de metionina adicionales. La Solicitud Internacional N° PCT/US06/47822 titulada "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides", describe la alquilación reductiva de restos de amina aromáticos, incluyendo pero sin limitación, p-aminofenilalanina y aminación reductiva.

En una realización, se proporcionan composiciones de un polipéptido de FGF-21 que incluyen un aminoácido no natural (tal como *p*-(propargiloxi)-fenilalanina). También se proporcionan diversas composiciones que comprenden *p*-(propargiloxi)-fenilalanina e, incluyendo pero sin limitación, proteínas y/o células. En un aspecto, una composición que incluye el aminoácido no natural *p*-(propargiloxi)-fenilalanina también incluye un ARNt ortogonal. El aminoácido

no natural puede unirse (incluyendo, pero sin limitación, de forma covalente) con el ARNt ortogonal, incluyendo pero sin limitación, la unión covalente con el ARN ortogonal a través de un enlace de aminoacilo, la unión covalente con un 3'OH o un 2'OH de un azúcar ribosa terminal del ARNt ortogonal, etc.

5 Los restos químicos a través de aminoácidos no naturales que pueden incorporarse en proteínas ofrecen una diversidad de ventajas y manipulaciones de la proteína. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional ceto permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de varios reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina *in vitro* e *in vivo*. Un aminoácido no natural con átomos pesados, por ejemplo, puede ser útil para el cálculo de las fases de datos de estructura de rayos X. La introducción específica de sitio de átomos pesados usando aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la selección de posiciones para átomos pesados. Los aminoácidos no naturales fotorreactivos (incluyendo, pero sin limitación, aminoácidos con cadenas laterales de benzofenona y arilazidas (incluyendo, pero sin limitación, fenilazida)), por ejemplo, posibilitan la fotorreticulación *in vivo* e *in vitro* eficaz de proteínas. Los ejemplos de aminoácidos no naturales fotorreactivos incluyen, pero sin limitación, p-azido-fenilalanina y p-benzoil-fenilalanina. La proteína con los aminoácidos no naturales fotorreactivos pueden después reticularse a voluntad por excitación del control temporal que proporciona el grupo fotorreactivo. En un ejemplo, el grupo metilo de un aminoácido no natural puede sustituirse con, incluyendo pero sin limitación, un grupo metilo marcado con isótopos, como una sonda de estructura local y dinámica, incluyendo, pero sin limitación, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia de vibración. Los grupos funcionales alquínico o azido, por ejemplo, permiten la modificación selectiva de proteínas con moléculas a través de una reacción de cicloadición [3+2].

20 Un aminoácido no natural incorporado en un polipéptido en el extremo amino terminal puede estar compuesto por un grupo R que es cualquier sustituyente distinto del usado en los veinte aminoácidos naturales y un 2° grupo reactivo diferente del grupo NH₂ normalmente presente en los α-aminoácidos (véase la Fórmula I). Puede incorporarse un aminoácido no natural similar en el extremo carboxilo terminal con un 2° grupo reactivo diferente del grupo COOH normalmente presente en los α-aminoácidos (véase la Fórmula I).

25 Los aminoácidos no naturales de la invención pueden seleccionarse o diseñarse para proporcionar características adicionales no disponibles en los veinte aminoácidos naturales. Por ejemplo, el aminoácido no natural puede opcionalmente diseñarse o seleccionarse para modificar las propiedades biológicas de una proteína, por ejemplo, en la que se incorporan. Por ejemplo, las siguientes propiedades pueden modificarse opcionalmente por inclusión de un aminoácido no natural en una proteína: toxicidad, biodistribución, solubilidad, estabilidad, por ejemplo, resistencia térmica, hidrolítica u oxidativa a la degradación enzimática y similares, facilidad de purificación y procesamiento, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas y/o fotoquímicas, actividad catalítica, potencial redox, semivida, capacidad para reaccionar con otras moléculas, por ejemplo, de forma covalente o de forma no covalente, y similares.

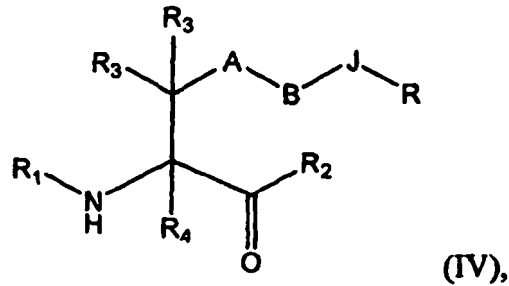
35 ESTRUCTURA Y SÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS SINTÉTICOS: GRUPOS CARBONILO, SIMILARES A CARBONILO, ENMASCARADOS CON CARBONILO, PROTEGIDOS CON CARBONILO Y GRUPOS HIDROXILAMINA

En algunas realizaciones la presente invención proporciona FGF-21 unidos a un polímero soluble en agua, por ejemplo, un PEG, mediante un enlace oxima.

40 Son adecuados muchos tipos de aminoácidos codificados sintéticamente para la formación de enlaces oxima. Estos incluyen, pero sin limitación, aminoácidos codificados sintéticamente que contienen un grupo carbonilo, dicarbonilo o hidroxilamina. Dichos aminoácidos se describen en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2006/0194256, 2006/0217532 y 2006/0217289 y el documento WO 2006/069246 titulado "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polipeptides". También se describen aminoácidos codificados sintéticamente en la Patente de Estados Unidos N° 7.083.970 y la Patente de Estados Unidos N° 7.045.337, que se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad.

Algunas realizaciones de la invención utilizan los polipéptidos FGF-21 que están sustituidos en una posición con un aminoácido para-acetilfenilalanina. La síntesis de p-acetil-(+/-)-fenilalanina y m-acetil-(+/-)-fenilalanina se describen en Zhang, Z., y col., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003). Pueden prepararse de forma análoga otros aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo por un experto en la técnica. Además, las síntesis ejemplares no limitantes de un aminoácido sintético que se incluyen en el presente documento se presentan en las figuras 4, 24-34 y 36-39 de la Patente de Estados Unidos N° 7.083.970.

Los aminoácidos con un grupo reactivo electrófilo permiten una diversidad de reacciones para unir las moléculas a través de reacciones de adición nucleófila, entre otras. Dichos grupos reactivos electrófilos incluyen un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo), un grupo similar a carbonilo (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) y es estructuralmente similar a un grupo carbonilo), un grupo carbonilo enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo)), o un grupo carbonilo protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) tras la desprotección). Dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (IV):

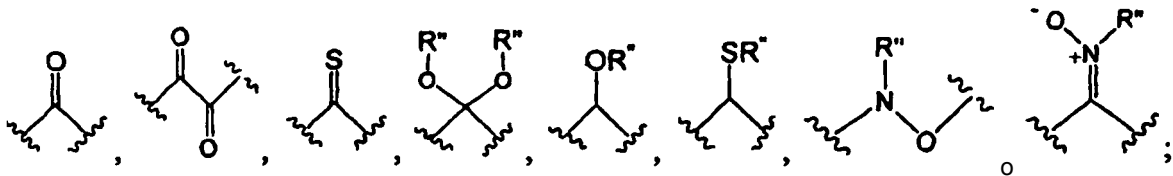


en la que:

5 A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

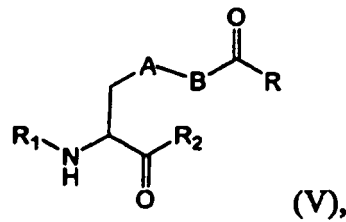
10 B es opcional, y cuando está presente es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

J es



20 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; cada R'' es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, o un grupo protector, o cuando está presente más de un grupo R'', dos R'' opcionalmente forman un heterocicloalquilo; R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; o los grupos -A-B-J-R forman juntos un cicloalquilo o heterocicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluyendo un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, incluyendo un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, incluyendo un grupo dicarbonilo enmascarado; o los grupos -J-R forman juntos un cicloalquilo o heterocicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluyendo un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, incluyendo un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, incluyendo un grupo dicarbonilo enmascarado; con la condición de que cuando A sea fenileno y cada R₃ sea H, B esté presente; y de que cuando A sea -(CH₂)₄- y cada R₃ sea H, B no sea -NHC(O)(CH₂CH₂)-; y de que cuando A y B estén ausentes y cada R₃ sea H, R no sea metilo.

Además, teniendo la estructura de Fórmula (V) se incluyen:



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

B es opcional, y cuando está presente es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

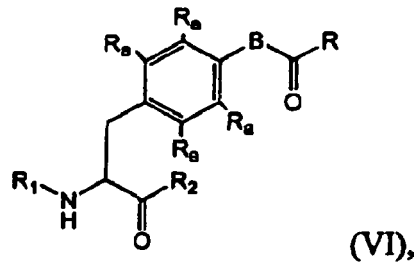
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

con la condición de que cuando A sea fenileno, B esté presente; y de que cuando A sea -(CH₂)₄-, B no sea -NHC(O)(CH₂CH₂)-; y de que cuando A y B estén ausentes, R no sea metilo.

Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (VI):



en la que:

B es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

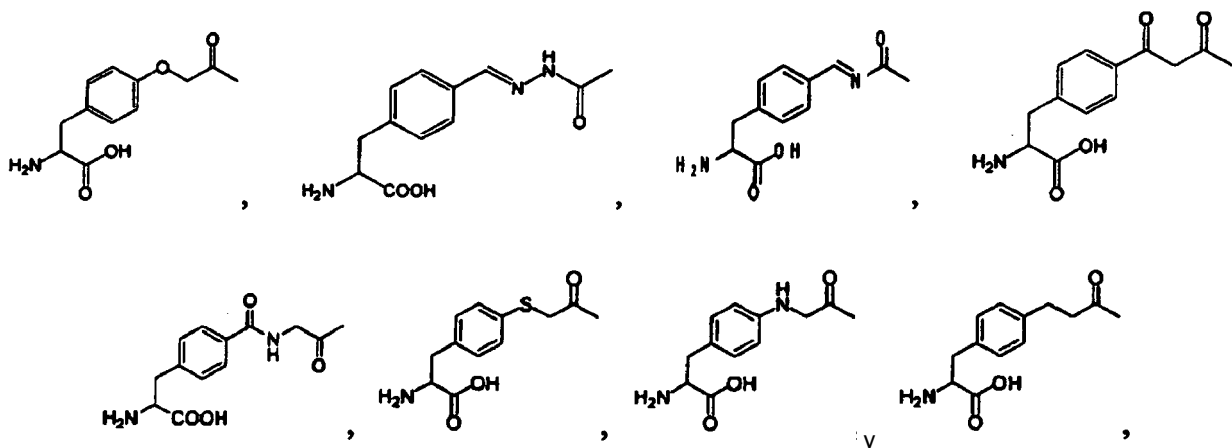
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

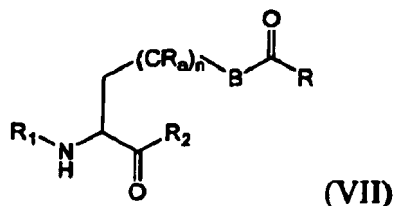
cada R_a se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂-, -C(O)_kR' en el que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂-, -OR' y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



- 5 en los que dichos compuestos son opcionalmente un grupo protegido amino, carboxilo protegido o una sal de los mismos. Además, cualquiera de los siguientes aminoácidos sintéticos puede incorporarse en un polipéptido aminoácido sintético.

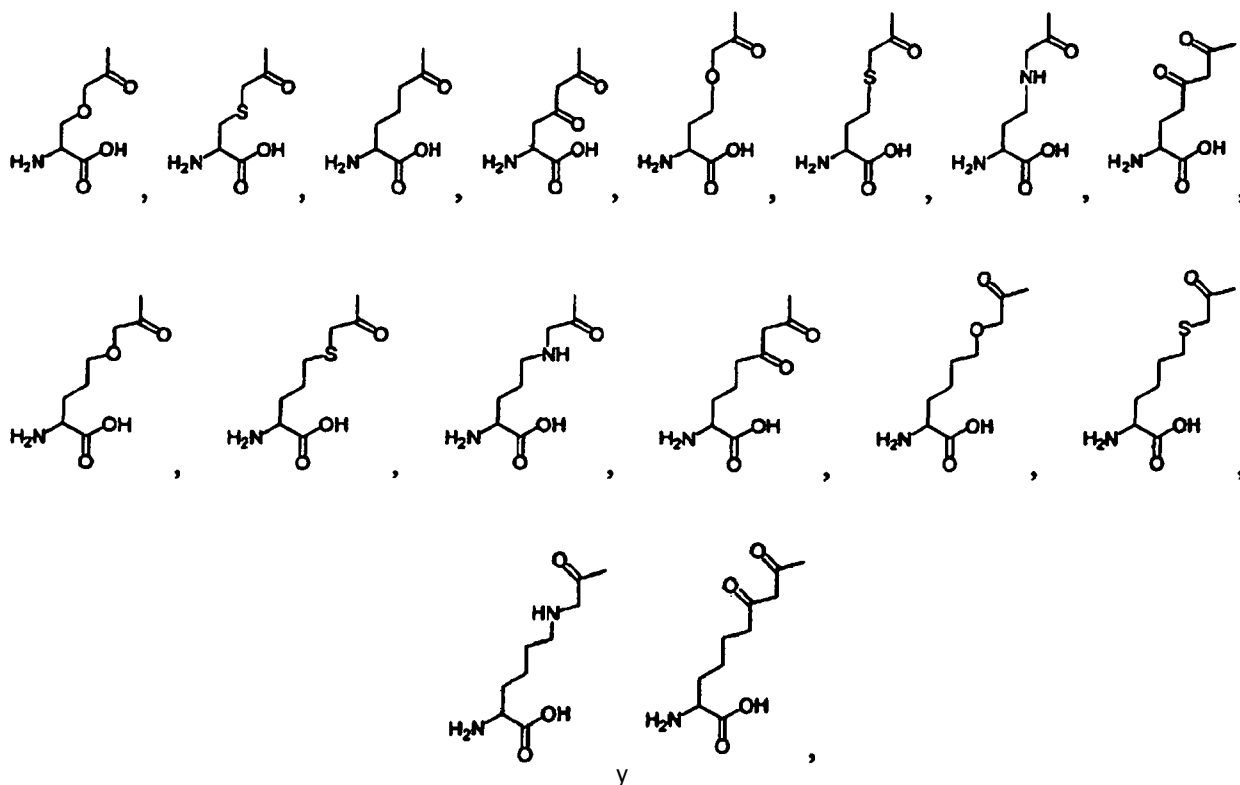
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (VII):



en la que

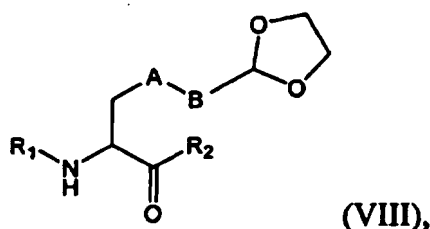
- 10 B es opcional, y cuando está presente es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido), -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido), -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;
- 15 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- 20 R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y
- R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;
- 25 cada R_a se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en el que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y
- n es de 0 a 8;
- con la condición de que cuando A sea -(CH₂)₄-, B no sea -NHC(O)(CH₂CH₂)-

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



5 en los que dichos compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido, o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos sintéticos y cualquiera de los siguientes aminoácidos sintéticos pueden incorporarse en un polipéptido aminoácido sintético.

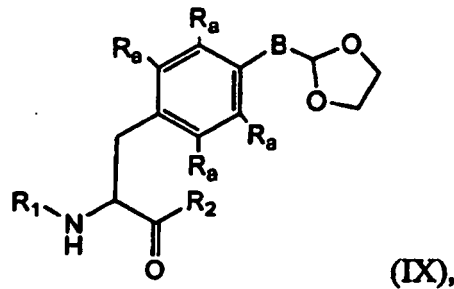
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (VIII):



en la que

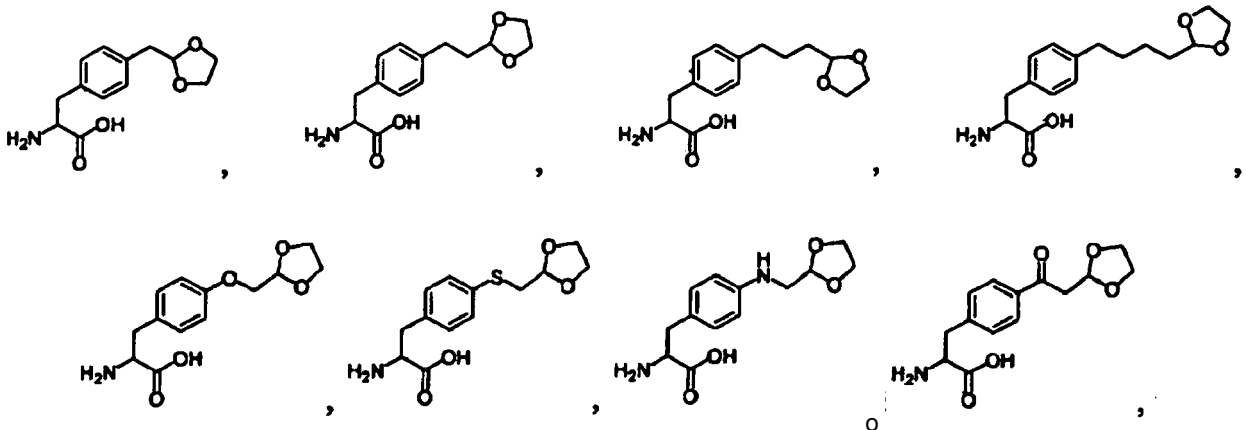
- 10 A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquilileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;
- 15 B es opcional, y cuando está presente es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido), -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido), -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;
- 20 R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y
- 25 R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (IX):



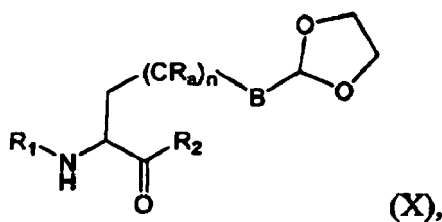
- B es opcional, y cuando está presente es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;
- R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y
- R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, polipéptidos o un polinucleótido;
- en la que cada R_a se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en la que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



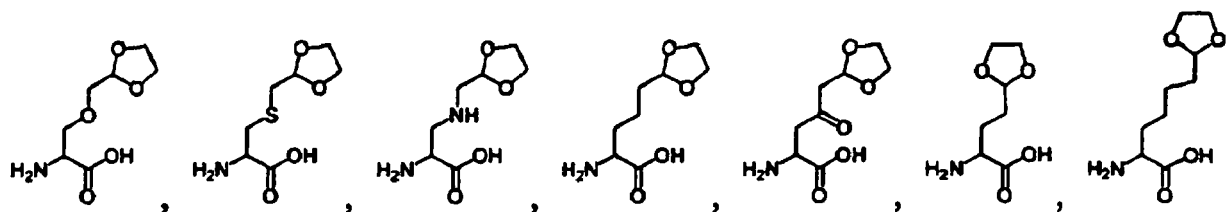
- en los que dichos compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido, o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos sintéticos y cualquiera de los siguientes aminoácidos sintéticos pueden incorporarse en un polipéptido aminoácido sintético.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (X):

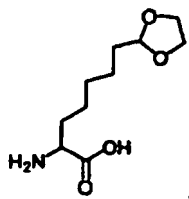


- en la que B es opcional, y cuando está presente es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituidos, alquilenos inferior sustituidos, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos inferior sustituidos, -O-, -O-(alquilenos o alquilenos sustituidos), -S-, -S-(alquilenos o alquilenos sustituidos), -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k (alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -C(O)-, -C(O)-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -C(S)-, -C(S)-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -N(R')-, -NR'-(alquilenos o alquilenos sustituidos), -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -N(R')CO-(alquilenos o alquilenos sustituidos)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;
- R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y
- R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;
- cada R_a se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en el que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y
- n es de 0 a 8.

- Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



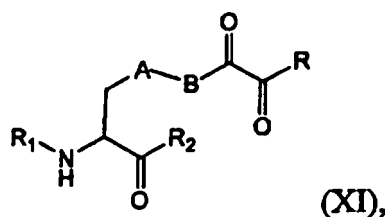
y



- en los que dichos compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido, o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos sintéticos y cualquiera de los siguientes aminoácidos sintéticos pueden incorporarse en un polipéptido aminoácido sintético.

Además de estructuras monocarbonilo, los aminoácidos sintéticos descritos en el presente documento pueden incluir grupos tales como dicarbonilo, similares a dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y grupos dicarbonilo protegido.

- Por ejemplo, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XI):



en la que A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

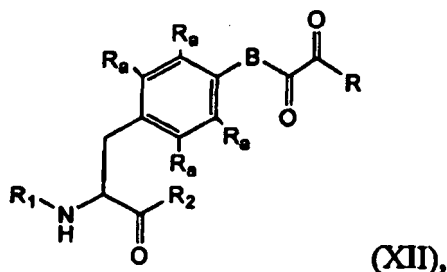
B es opcional, y cuando está presente es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XII):



B es opcional, y cuando está presente es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-M=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

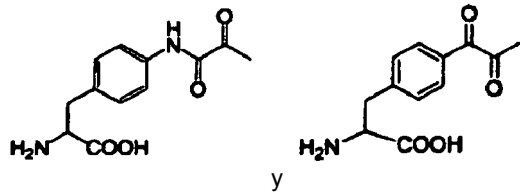
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

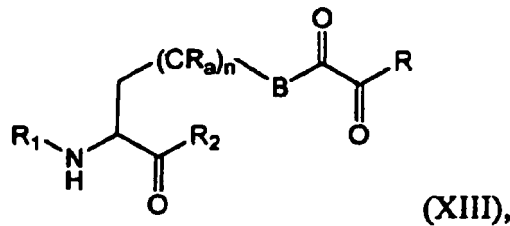
en la que cada R_a se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en el que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



5 en los que dichos compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido, o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos sintéticos y cualquiera de los siguientes aminoácidos sintéticos pueden incorporarse en un polipéptido aminoácido sintético.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIII):



10 en la que B es opcional, y cuando está presente es un conector seleccionado entre el grupo que consiste en alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior sustituido, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos inferior sustituido, -O-, -O-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S-, -S-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquilenos o alquilenos sustituido), -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquilenos o alquilenos sustituido), -N(R')CO-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N-, -C(R')₂-N-N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

15 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

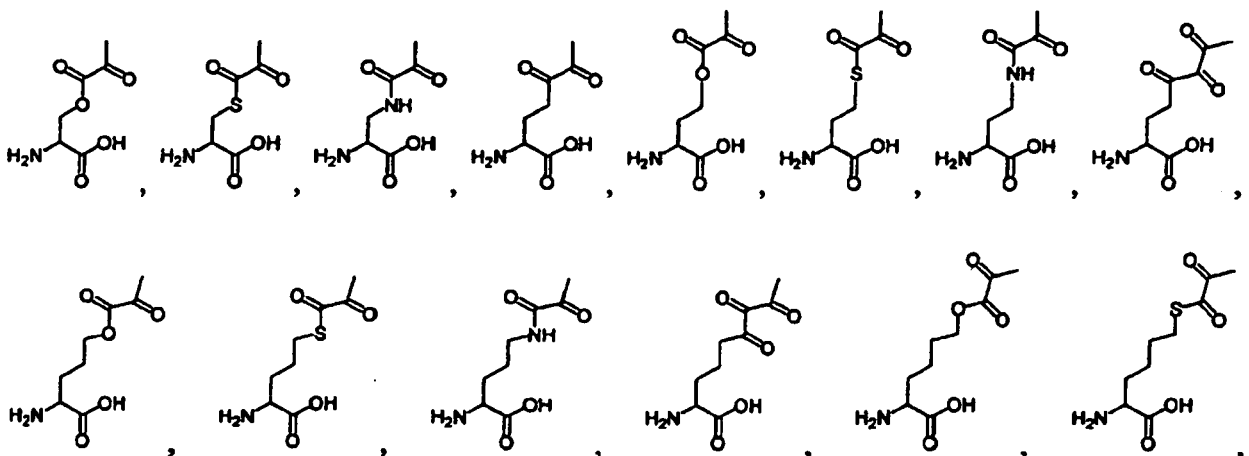
R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

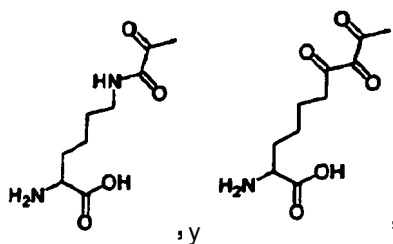
20 R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

cada R_a se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en el que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y

25 n es de 0 a 8.

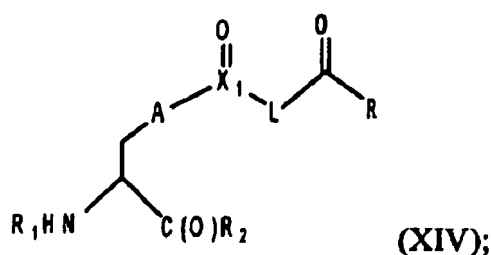
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:





5 en los que dichos compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido, o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos sintéticos y cualquiera de los siguientes aminoácidos sintéticos pueden incorporarse en un polipéptido aminoácido sintético.

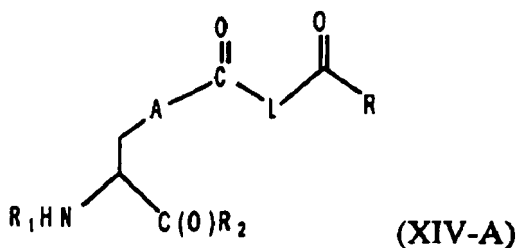
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIV):



en la que:

- 10 A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;
- 15 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y
- R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;
- 20 X₁ es C, S o S(O); y
- L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), en la que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIV-A):



en la que:

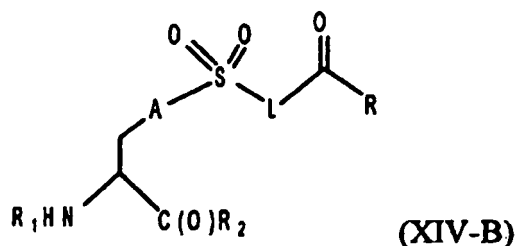
- 25 A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;
- 30 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

- 5 L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), en la que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIV-B):



en la que:

- 10 A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

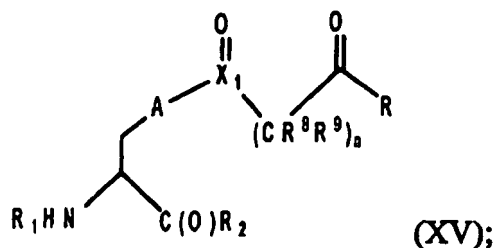
- 15 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

- 20 L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), en la que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XV):



en la que:

- 25 A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

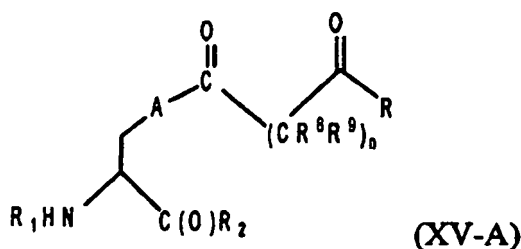
- 30 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

- 35 X₁ es C, S o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ puede formar =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XV-A):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

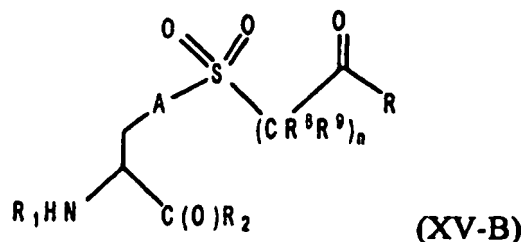
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ puede formar =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar un cicloalquilo.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XV-B):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

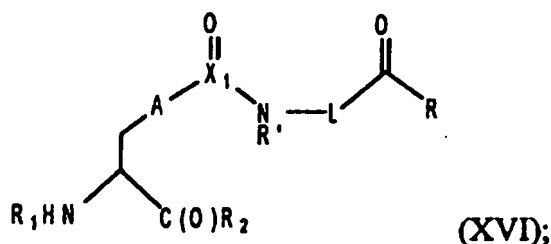
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ puede formar =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVI):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

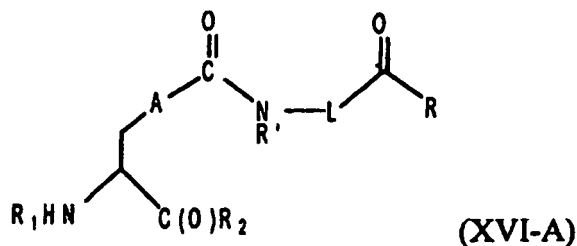
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

X₁ es C, S o S(O); y L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), en la que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVI-A):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

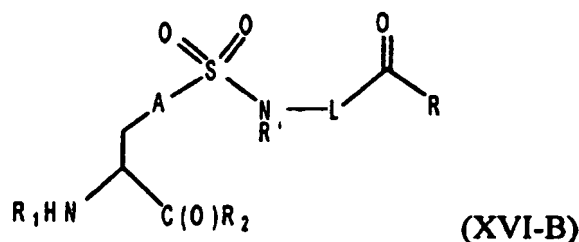
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), en la que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVI-B):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

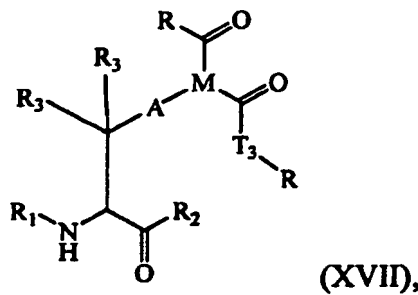
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), en la que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

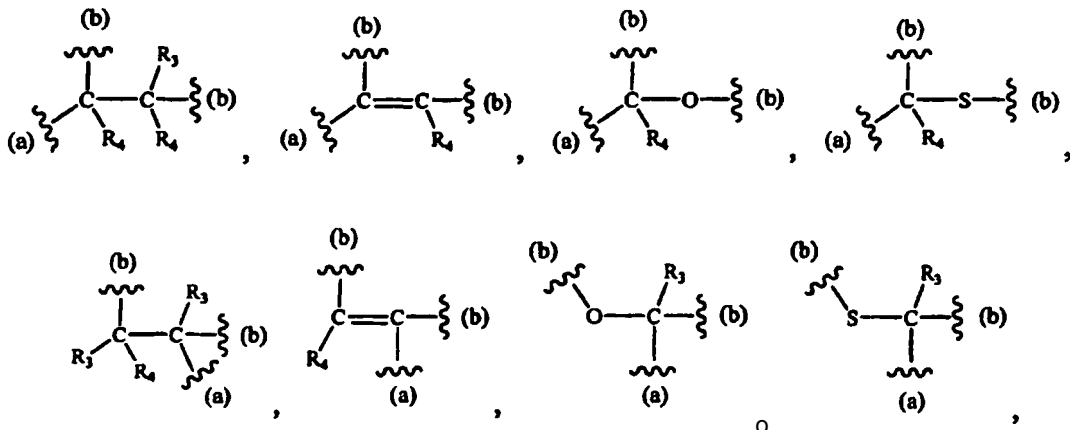
Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVII):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alkarileno, alkarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

M es -C(R₃)-,



en los que (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los grupos carbonilo respectivos,

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ o dos grupos R₄ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

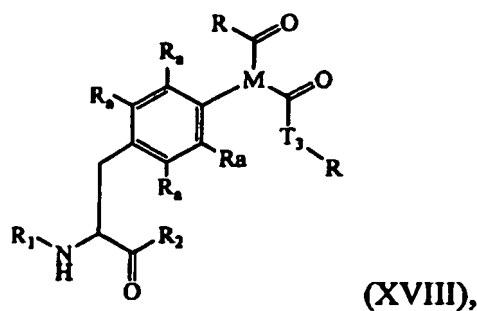
R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

T₃ es un enlace, C(R)(R), O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

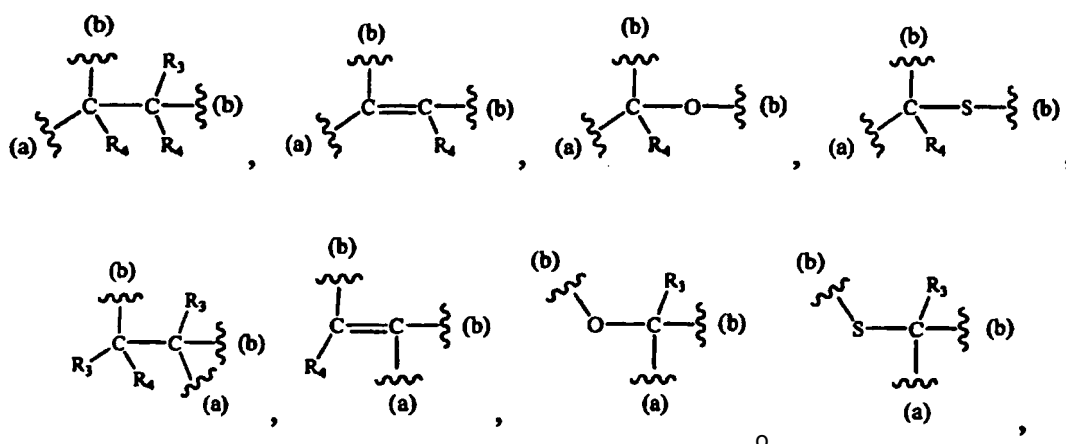
R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido.

Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVIII):



en la que:

M es -C(R₃)-,



5

en los que (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los grupos carbonilo respectivos, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ o dos grupos R₄ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

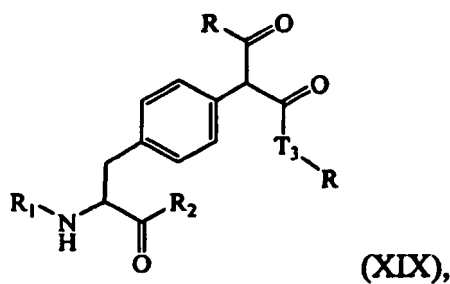
10 T₃ es un enlace, C(R)(R), O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, una resina, un aminoácido, un polipéptido o un polinucleótido;

15 cada R_a se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en el que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIX):

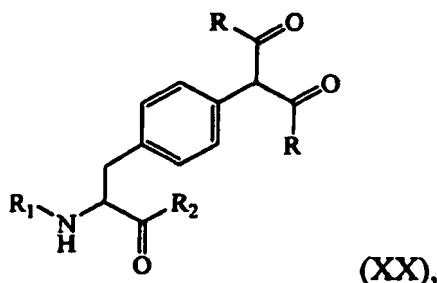


20 en la que:

R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; y

T₃ es O o S.

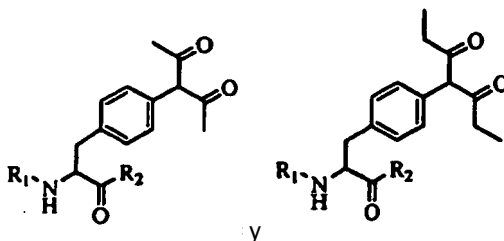
Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XX):



en la que:

- 5 R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen las estructuras de Fórmula (XXI):



En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido sintético se modifica químicamente para generar un carbonilo reactivo o un grupo funcional dicarbonilo. Por ejemplo, puede generarse una funcionalidad aldehído útil para reacciones de conjugación a partir de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, una serina o treonina N-terminal (que puede estar presente normalmente o puede exponerse mediante digestión química o enzimática) puede usarse para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa moderadas usando peryodato. Véanse, por ejemplo, Gaertner, y col., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3: 138-146(1992); Gaertner y col., *J. Biol. Chem.* 269: 7224-7230 (1994). Sin embargo, los procedimientos conocidos en la técnica se limitan al aminoácido en el extremo N del péptido o la proteína.

En la presente invención, un aminoácido sintético que tiene grupos hidroxilo y amino adyacentes puede incorporarse en el polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, la 5-hidroxiserina tiene un grupo hidroxilo adyacente a la epsilon amina. Las condiciones de reacción para generar el aldehído típicamente implican la adición de un exceso molar de metaperyodato sódico en condiciones moderadas para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es típicamente aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de un exceso molar de aproximadamente 1,5 de meta peryodato sódico a una solución tamponada del polipéptido seguido de incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 6.423.685.

La funcionalidad carbonilo o dicarbonilo puede reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidroxilamina en condiciones moderadas en una solución acuosa para formar la unión oxima correspondiente que es estable en condiciones fisiológicas. Véanse, por ejemplo, Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117: 3893-3899 (1995). Además, la única reactividad del grupo carbonilo o dicarbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las demás cadenas laterales aminoacídicas. Véanse, por ejemplo, Cornish, V. W., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 118: 8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3: 138-146 (1992); Mahal, L. K., y col., *Science* 276: 1125-1128 (1997). *Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroxylamine-Containing Amino Acids*

Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/638.418. Por lo tanto, las divulgaciones proporcionadas en la Sección V (titulada "Aminoácidos Sintéticos (*Non-natural Amino Acids*)"), la Parte B (titulada "Estructura y Síntesis de Aminoácidos Sintéticos: Aminoácidos que Contienen Hidroxilamina (*Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroxylamine-Containing Amino Acids*)"), en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/638.418 se aplican por completo a los procedimientos, composiciones (incluyendo las Fórmulas I-XXXV), técnicas y estrategias para fabricar, purificar, caracterizar y usar los aminoácidos sintéticos, polipéptidos aminoacídicos sintéticos y polipéptidos aminoacídicos sintéticos modificados descritos en el presente documento en la misma medida como si dichas divulgaciones se presentaran completamente en el presente documento.

Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2006/0194256, 2006/0217532 y 2006/0217289 y el documento WO 2006/069246 titulado "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polipeptides".

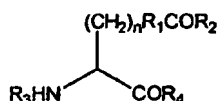
SÍNTESIS QUÍMICA DE AMINOÁCIDOS SINTÉTICOS

- 5 Muchos de los aminoácidos sintéticos adecuados para su uso en la presente invención están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Sigma (Estados Unidos) o Aldrich (Milwaukee, WI, Estados Unidos). Los que no están disponibles en el mercado se sintetizan opcionalmente como se proporciona en el presente documento, o como se proporciona en diversas publicaciones, o usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Para conocer técnicas de síntesis orgánica véase, por ejemplo, Organic Chemistry de Fessenden y Fessenden, (1982, Segunda Edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry de March (Tercera Edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York); y Advanced Organic Chemistry de Carey y Sundberg (Tercera Edición, Partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Las publicaciones adicionales que describen la síntesis de aminoácidos sintéticos incluyen, por ejemplo, el documento WO 2002/085923 titulado "*In vivo* incorporation of Unnatural Amino Acids;" Matsoukas y col., (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J.C. y col. (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4-[[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamina through Amino Acid Decarboxylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 50: 1239-1246; Barton y col., (1987) Synthesis of Novel alpha-Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D-alpha-Amino-Adipic Acids, L-alpha-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297-4308; y, Subasinghe y col., (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35: 4602-7. Véase también la Publicación de Patente de Estados Unidos N° US 2004/0198637 titulada "Protein Arrays".

A. Grupos reactivos carbonilo

- 30 Los aminoácidos con un grupo reactivo carbonilo permiten una diversidad de reacciones para unir moléculas (incluyendo, pero sin limitación, PEG u otras moléculas solubles en agua) a través de una adición nucleófila o reacciones de condensación con aldol, entre otras.

Los aminoácidos ejemplares que contienen carbonilo pueden representarse como se indica a continuación:



- 35 en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R₂ es H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino, y R₄ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo y R₂ es un alquilo sencillo (es decir, metilo, etilo o propilo) y el resto cetona se sitúa en la posición *para* con respecto a la cadena lateral alquilo. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo y R₂ es un alquilo sencillo (es decir, metilo, etilo o propilo) y el resto cetona se sitúa en la posición *meta* con respecto a la cadena lateral alquilo.

La síntesis de p-acetil-(+/-)-fenilalanina y m-acetil-(+/-)-fenilalanina se describe en Zhang, Z., y col., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003). Pueden prepararse de forma análoga otros aminoácidos que contienen carbonilo por un experto en la técnica.

- 45 En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido codificado sintéticamente se modifica químicamente para generar un grupo funcional reactivo carbonilo. Por ejemplo, puede generarse una funcionalidad aldehído útil para las reacciones de conjugación a partir de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, una serina o treonina N-terminal (que puede estar presente normalmente o puede estar expuesta a través de digestión química o enzimática) puede usarse para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativas moderadas usando peryodato. Véase, por ejemplo, Gaertner, y col., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Gaertner y col., J. Biol. Chem. 269: 7224-7230 (1994). Sin embargo, los procedimientos conocidos en la técnica se limitan al aminoácido en el extremo N del péptido o la proteína.

En la presente invención, un aminoácido codificado sintéticamente que tiene grupos hidroxilo y amino adyacentes puede incorporarse en el polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, la 5-hidroxilisina

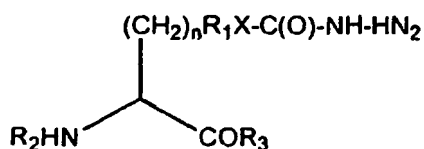
5 tiene un grupo hidroxilo adyacente a la epsilon amina. Las condiciones de reacción para generar el aldehído típicamente implican la adición de un exceso molar de metaperyodato sódico en condiciones moderadas para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es típicamente aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de un exceso molar de aproximadamente 1,5 de meta peryodato sódico a una solución tamponada del polipéptido seguido de incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 6.423.685.

10 La funcionalidad carbonilo puede reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidrazina, hidrazida, hidroxilamina o semi-carbazida en condiciones moderadas en una solución acuosa para formar las uniones de hidrazona, oxima o semicarbazona correspondientes, respectivamente, que son estables en condiciones fisiológicas. Véase, por ejemplo, Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995). Además, la única reactividad del grupo carbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las demás cadena laterales aminoácídicas. Véase, por ejemplo, Cornish, V. W., y col., J. Am. Chem. Soc. 118: 8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Mahal, L. K., y col., Science 276: 1125-1128 (1997).

15 B. Grupos reactivos de hidrazina, hidrazida o semicarbazida

Los aminoácidos codificados sintéticamente que contienen un grupo nucleófilo, tal como una hidrazina, hidrazida o semi-carbazida, permiten la reacción con una diversidad de grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero sin limitación, con PEG u otros polímeros solubles en agua).

20 Los aminoácidos que contienen hidrazina, hidrazida o semicarbazida ejemplares pueden representarse como se indica a continuación:



en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido o no está presente; X, es O, N o S o no está presente; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi.

25 En algunas realizaciones, n es 4, R₁ no está presente y X es N. En algunas realizaciones, n es 2, R₁ no está presente y X no está presente. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, y el átomo de oxígeno se sitúa en la posición *para* con respecto al grupo alifático en el anillo arilo.

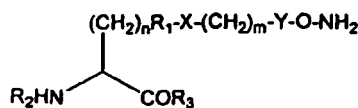
30 Los aminoácidos que contienen hidrazida, hidrazina y semicarbazida están disponibles a partir de fuentes comerciales. Por ejemplo, el L-glutamato-γ-hidrazida está disponible en Sigma Chemical (St. Louis, MO). Pueden prepararse otros aminoácidos que no estén disponibles en el mercado por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N° 6.281.211.

35 Los polipéptidos que contienen aminoácidos codificados sintéticamente que llevan funcionalidades hidrazida, hidrazina o semicarbazida pueden hacerse reaccionar de forma eficaz y selectiva con una diversidad de moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Véase, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995). La única reactividad de grupos funcionales hidrazida, hidrazina y semicarbazida los hace significativamente más reactivos a los aldehídos, cetonas y otros grupos electrófilos en comparación con los grupos nucleófilos presentes en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitación, el grupo hidroxilo de la serina o la treonina o los grupos amino de la lisina y el extremo N).

C. Aminoácidos que contienen Aminooxi

40 Los aminoácidos codificados sintéticamente que contienen un grupo aminooxi (también denominado una hidroxilamina) permiten la reacción con una diversidad de grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero sin limitación, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Al igual que las hidrazinas, hidrazidas y las semicarbazidas, la nucleofilicidad mejorada del grupo aminooxi le permite reaccionar de forma eficaz y selectiva con una diversidad de moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con una reactividad química similar. Véase, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995); H. Hang y C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34: 727-736 (2001). Mientras que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, no obstante, una oxima da como resultado generalmente la reacción de un grupo aminooxi con un grupo que contiene carbonilo, tal como una cetona.

Los aminoácidos ejemplares que contienen grupo aminooxi pueden representarse como se indica a continuación:



en la que n es 0-1,0; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; Y = C(O) o no está presente; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 1, e Y está presente. En algunas realizaciones, n es 2, R₁ y X no están presentes, m es 0, e Y no está presente.

Los aminoácidos que contienen aminooxi pueden prepararse a partir de precursores aminoacídicos fácilmente disponibles (homoserina, serina y treonina). Véase, por ejemplo, M. Carrasco y R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003). Ciertos aminoácidos que contienen aminooxi, tales como ácido L-2-amino-4-(aminooxi)butírico, se han aislado a partir de fuentes naturales (Rosenthal, G., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997)). Pueden prepararse otros aminoácidos que contienen aminooxi por un experto en la técnica.

D. Grupos reactivos azida y alquino

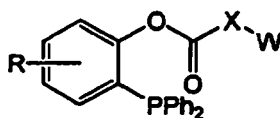
La única reactividad de los grupos funcionales azida y alquino los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas. Las azidas orgánicas, particularmente azidas alifáticas, y alquinos son estables generalmente a condiciones químicas reactivas comunes. En particular, tanto la azida como los grupos funcionales alquino son inertes a las cadenas laterales (es decir, los grupos R) de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en los polipéptidos de origen natural. Cuando se aproximan, sin embargo, la naturaleza "propensa a reaccionar" de la azida y los grupos alquino se revela y reaccionan selectiva y eficazmente a través de una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] para generar el triazol correspondiente. Véanse, por ejemplo, Chin J., y col., Science 301: 964-7 (2003); Wang, Q., y col., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., y col., J. Am. Chem. Soc. 124: 9026-9027 (2002).

Ya que la reacción de cicloadición de Huisgen implica una reacción de cicloadición selectiva (véase, por ejemplo, Padwa, A., en COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), pág. 1069-1109; Huisgen, R. en 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY, (ed. Padwa, A., 1984), pág. 1-176) en lugar de una sustitución nucleófila, la incorporación de aminoácidos codificados sintéticamente que tienen azida y cadenas laterales que contienen alquino permite que los polipéptidos resultantes se modifiquen selectivamente en la posición del aminoácido codificado sintéticamente. La reacción de cicloadición que implica una azida o un polipéptido FGF-21 que contiene alquino puede realizarse a temperatura ambiente en condiciones acuosas mediante la adición de Cu (II) (incluyendo, pero sin limitación, en forma de una cantidad catalítica de CuSO₄) en presencia de un agente reductor para reducir Cu(II) a Cu(I), *in situ*, en una cantidad catalítica. Véase, por ejemplo, Wang, Q., y col., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., y col., J. Org. Chem. 67: 3057-3064 (2002); Rostovtsev, y col., Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596-2599 (2002). Los agentes reductores ejemplares incluyen, pero sin limitación, ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe²⁺, Co²⁺, y un potencial eléctrico aplicado.

En algunos casos, cuando se desea una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] entre una azida y un alquino, el polipéptido FGF-21 comprende un aminoácido codificado sintéticamente que comprende un resto alquino, y el polímero soluble en agua que va a unir al aminoácido comprende un resto azida. Como alternativa, también puede realizarse la reacción inversa (es decir, con el resto azida en el aminoácido y el resto alquino presente en el polímero soluble en agua).

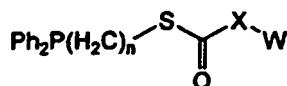
El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un éster arílico y puede funcionalizarse apropiadamente con un resto aril fosfina para generar una unión amida. El grupo aril fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante después reacciona de forma eficaz con una unión éster proximal para generar la amida correspondiente. Véase, por ejemplo, E. Saxon y C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000). El aminoácido que contiene azida puede ser una alquil azida (incluyendo, pero sin limitación, ácido 2-amino-6-azido-1-hexanoico) o una aril azida (p-azido-fenilalanina).

Los polímeros solubles en agua ejemplares que contienen un aril éster y un resto fosfina pueden representarse como se indica a continuación:



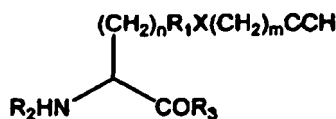
en la que X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y grupos arilo sustituido. Los grupos R ejemplares incluyen pero sin limitación $-\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, $-\text{halógeno}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{CN}$ y $-\text{NO}_2$. Cada uno de R', R'', R''' y R'''' se refiere independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, incluyendo, pero sin limitación, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o sin sustituir, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, $-\text{NR}'\text{R}''$ pretende incluir, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir del análisis de sustituyentes anterior, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo, pero sin limitación, $-\text{CF}_3$ y $-\text{CH}_2\text{CF}_3$) y acilo (incluyendo, pero sin limitación, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$, y similares).

El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un tioéster y se funcionaliza apropiadamente con un resto aril fosfina para generar una unión amida. El grupo aril fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante después reacciona de forma eficaz con la unión tioéster para generar la amida correspondiente. Los polímeros solubles en agua ejemplares que contienen un tioéster y un resto fosfina pueden representarse como se indica a continuación:



en la que n es 1-10; X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, y W es un polímero soluble en agua.

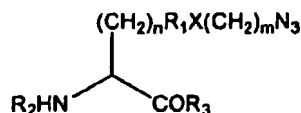
Los aminoácidos que contienen alquino ejemplares pueden representarse como se indica a continuación:



en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10, R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X no está presente, m es 0 y el resto acetileno se sitúan en la posición *para* con respecto a la cadena lateral alquilo. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 1 y el grupo propargiloxi se sitúa en la posición *para* con respecto a la cadena lateral alquilo (es decir, O-propargil-tirosina). En algunas realizaciones, n es 1, R₁ y X no están presentes y m es 0 (es decir, proparilglicina).

Los aminoácidos que contienen alquino están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la propargilglicina está disponible en el mercado en Peptech (Burlington, MA). Como alternativa, los aminoácidos que contienen alquino pueden prepararse de acuerdo con procedimientos convencionales. Por ejemplo, la p-propargiloxifenilalanina puede sintetizarse, por ejemplo, como se describe en Deiters, A., y col., J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003), y la 4-alquiniil-L-fenilalanina puede sintetizarse como se describe en Kayser, B., y col., Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997). Pueden prepararse otros aminoácidos que contienen alquino por un experto en la técnica.

Los aminoácidos ejemplares que contienen azida pueden representarse como se indica a continuación:



en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X no está presente, m es 0 y el resto azida se sitúa en la posición *para* con respecto a la cadena lateral alquilo. En algunas realizaciones, n es 0-4 y R₁ y X no están presentes, y m = 0. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 2 y el resto β-azidoetoxi se sitúa en la posición *para* con respecto a la cadena lateral alquilo.

Los aminoácidos que contienen azida están disponibles a partir de fuentes comerciales. Por ejemplo, la 4-azidofenilalanina puede obtenerse en Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL). Para aquellos aminoácidos que contienen azida que no están disponibles en el mercado, el grupo azida puede prepararse relativamente fácil usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, mediante desplazamiento de un grupo saliente adecuado (incluyendo, pero sin limitación, haluro, mesilato, tosilato) o a través de la apertura de una lactona protegida adecuadamente. Véase, por ejemplo, *Advanced Organic Chemistry* de March (Tercera Edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York).

E. Grupos reactivos aminotiol

La única reactividad de los grupos funcionales aminotio beta-sustituidos los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas que contienen grupos aldehído a través de la formación de la tiazolidina. Véase, por ejemplo, J. Shao y J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899. En algunas realizaciones, los aminoácidos aminotiol beta-sustituidos pueden incorporarse en los polipéptidos FGF-21 y después reaccionan con polímeros solubles en agua que comprenden una funcionalidad aldehído. En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua, un conjugado de fármacos u otra carga puede acoplarse a un polipéptido FGF-21 que comprende un aminoácido aminotiol beta-sustituido a través de la formación de la tiazolidina.

F. Grupos reactivos adicionales

Se describen grupos reactivos adicionales y aminoácidos codificados sintéticamente que pueden incorporarse en los polipéptidos FGF-21 de la invención en las siguientes solicitudes de patente: Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0194256, Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0217532, Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0217289, Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/755.338; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/755.711; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/755.018; Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US06/49397; documento WO 2006/069246; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/743.041; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/743.040; Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US06/47822; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/882.819; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/882.500; y Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/870.594.

Captación celular de aminoácidos no naturales

La captación de aminoácidos no naturales por una célula es una cuestión que típicamente se considera cuando se diseñan y seleccionan aminoácidos no naturales, incluyendo pero sin limitación, para incorporación en una proteína. Por ejemplo, la alta densidad de carga de los α -aminoácidos sugiere que estos compuestos probablemente no sean permeables para las células. Los aminoácidos naturales se captan en la célula eucariota mediante una colección de sistemas de transporte basados en proteínas. Puede realizarse una exploración rápida que evalúa que aminoácidos no naturales, si los hubiera, se captan por las células. Véanse, por ejemplo, los ensayos de toxicidad en, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° US 2004/0198637 titulada "Protein Arrays"; y Liu, D. R. & Schultz, P. G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. *PNAS United States* 96: 4780-4785. A pesar de que la captación se analiza fácilmente con diversos ensayos, una alternativa al diseño de aminoácidos no naturales que sean susceptibles de rutas de captación celular es proporcionar rutas biosintéticas para crear aminoácidos *in vivo*.

Biosíntesis de aminoácidos no naturales

Existen ya muchas rutas biosintéticas en las células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Aunque puede no existir en la naturaleza un procedimiento biosintético para un aminoácido no natural particular, incluyendo pero sin limitación, en una célula, la divulgación proporciona tales procedimientos. Por ejemplo, en una célula huésped se generan opcionalmente rutas biosintéticas para aminoácidos no naturales añadiendo nuevas enzimas o modificando rutas de células huésped existentes. Las nuevas enzimas adicionales son opcionalmente enzimas de origen natural o enzimas desarrolladas artificialmente. Por ejemplo, la biosíntesis de p-aminofenilalanina (como se presenta en un ejemplo en el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los genes para estas enzimas pueden introducirse en una célula eucariota transformando la célula con un plásmido que comprende los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una ruta enzimática para sintetizar el compuesto deseado. En los ejemplos presentados más adelante se proporcionan ejemplos de los tipos de enzimas que opcionalmente se añaden. Se encuentran secuencias de enzimas adicionales, por ejemplo, en Genbank. También se añaden opcionalmente enzimas desarrolladas artificialmente a una célula de la misma manera. De esta manera, la maquinaria celular y los recursos de una célula se manipulan para producir aminoácidos no naturales.

Está disponible una diversidad de procedimientos para producir nuevas enzimas para su uso en rutas biosintéticas o para evolución de rutas existentes. Por ejemplo, se usa opcionalmente recombinación recursiva, incluyendo pero sin limitación, como se desarrolla por Maxygen, Inc. (disponible en Internet en maxygen.com), para desarrollar nuevas enzimas y rutas. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, *Nature* 370(4): 389-391; y, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination

for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91: 10747-10751. De forma similar DesignPath™, desarrollado por Genencor (disponible en Internet en genencor.com) se usa opcionalmente para ingeniería genética de rutas metabólicas incluyendo, pero sin limitación, para modificar por ingeniería genética una ruta para crear O-metil-L-tirosina en una célula. Esta tecnología reconstruye rutas existentes en organismos huésped usando una combinación de nuevos genes incluyendo, pero sin limitación, los identificados a través de genómica funcional, y evolución y diseño molecular. Diversa Corporation (disponible en Internet en diversa.com) también proporciona tecnología para explorar rápidamente bibliotecas de genes y rutas de genes incluyendo, pero sin limitación, para crear nuevas rutas.

Típicamente, el aminoácido no natural producido con una ruta biosintética modificada por ingeniería genética de la invención se produce en una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficaz, incluyendo pero sin limitación, una cantidad celular natural, pero no hasta un grado tal que afecte a la concentración de los otros aminoácidos o agote los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas *in vivo* de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que la célula se transforma con un plásmido que comprende los genes usados para producir enzimas deseadas para una ruta específica y se genera un aminoácido no natural, las selecciones *in vivo* se usan opcionalmente para optimizar adicionalmente la producción del aminoácido no natural tanto para síntesis de proteínas ribosomales como para crecimiento celular.

Polipéptidos con aminoácido no naturales

La incorporación de un aminoácido no natural puede realizarse para una diversidad de fines, incluyendo pero sin limitación, adaptar cambios en la estructura y/o función de una proteína, cambiar el tamaño, acidez, nucleofilia, enlaces de hidrógeno, hidrofobia, accesibilidad de los sitios diana de proteasa, dirección a un resto (incluyendo, pero sin limitación, para una matriz proteica), añadir una molécula biológicamente activa, unir un polímero, unir un radionúclido, modular la semivida en suero, modular la penetración tisular (por ejemplo tumores), modular el transporte activo, modular la especificidad o distribución en un tejido, célula u órgano, modular la inmunogenicidad, modular la resistencia a proteasa, etc. Las proteínas que incluyen un aminoácido no natural pueden tener propiedades biofísicas o catalíticas mejoradas o incluso completamente nuevas. Por ejemplo, las siguientes propiedades se modifican opcionalmente por inclusión de un aminoácido no natural en una proteína: toxicidad, biodistribución, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas y/o fotoquímicas, capacidad catalítica, semivida (incluyendo, pero sin limitación, semivida en suero), capacidad para reaccionar con otras moléculas incluyendo, pero sin limitación, de forma covalente o no covalente, y similares. Las composiciones, incluyendo proteínas que incluyen al menos un aminoácido no natural, son útiles para, incluyendo pero sin limitación, nuevos agentes terapéuticos, diagnóstico, enzimas catalíticas, enzimas industriales, proteínas de unión (incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos), e incluyendo, pero sin limitación, el estudio de la estructura y función de la proteína. Véase, por ejemplo, Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4: 645-652.

En un aspecto de la invención, una composición incluye al menos una proteína con un aminoácido no natural.

Una característica de la invención son proteínas o polipéptidos de interés con un aminoácido no natural. La invención también incluye polipéptidos o proteínas con un aminoácido no natural producido usando las composiciones y procedimientos de la invención. También puede estar presente con la proteína un excipiente (incluyendo pero sin limitación, un excipiente farmacéuticamente aceptable).

Al producir proteínas o polipéptidos de interés con un aminoácido no natural en células eucariotas, las proteínas o polipéptidos típicamente incluirán modificaciones postraduccionales eucariotas. En ciertas realizaciones, una proteína incluye un aminoácido no natural y al menos una modificación postraducciona que se realiza *in vivo* por una célula eucariota, en la que la modificación postraducciona no se realiza por una célula procariota. Por ejemplo, la modificación postraducciona incluye, pero sin limitación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de enlaces de glicolípidos, glicosilación y similares. En un aspecto, la modificación postraducciona incluye unión de un oligosacárido (incluyendo, pero sin limitación, (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc) con una asparagina por un enlace de GlcNAc-asparagina. Véase la Tabla 1 que enumera algunos ejemplos de oligosacáridos ligados a N de proteínas eucariotas (también pueden estar presentes restos adicionales, que no se muestran). En otro aspecto, la modificación postraducciona incluye unión de un oligosacárido (incluyendo, pero sin limitación, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) con una serina o treonina por un enlace de GalNAc-serina o GalNAc-treonina, o un enlace de GlcNAc-serina o GlcNAc-treonina.

TABLA 1: EJEMPLOS DE OLIGOSACÁRIDOS A TRAVÉS DE ENLACE GlcNAc

Tipo	Estructura Base
Alto contenido de manosa	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn} $
Híbrido	$ \begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \\ \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \end{array} \begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn} $
Complejo	$ \begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \\ \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \end{array} \begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn} $
Xilosa	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Xyl}\beta\text{1-2} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn} $

En otro aspecto más, la modificación postraduccional incluye procesamiento proteolítico de precursores (incluyendo, pero sin limitación, precursor de calcitonina, precursor de péptido relacionado con gen de calcitonina, hormona preproparatiroidea, preproinsulina, proinsulina, preproopiomelanocortina, proopiomelanocortina y similares), ensamblaje en una proteína de múltiples subunidades o ensamblaje macromolecular, traslación a otro sitio en la célula (incluyendo, pero sin limitación, orgánulos, tales como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, el núcleo, lisosomas, peroxisomas, mitocondrias, cloroplastos, vacuolas, etc., o a través de la ruta secretora). En ciertas realizaciones, la proteína comprende una secuencia de secreción o localización, un marcador epitópico, un marcador FLAG, un marcador de polihistidina, una fusión de GST, o similares.

Una ventaja del aminoácido no natural es que presenta restos químicos adicionales que pueden usarse para añadir moléculas adicionales. Estas modificaciones pueden realizarse *in vivo* en una célula eucariota o no eucariota, o *in vitro*. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la modificación postraduccional es a través del aminoácido no natural. Por ejemplo, la modificación postraduccional puede ser a través de una reacción nucleófila-electrófila. La mayoría de las reacciones usadas actualmente para la modificación selectiva de proteínas implican formación de enlaces covalentes entre compañeros de reacción nucleófilos y electrófilos, incluyendo, pero sin limitación, la reacción de α -halocetonas con cadenas laterales de histidina o cisteína. La selectividad en estos casos se determina por el número y accesibilidad de los restos nucleófilos en la proteína. En proteínas de la invención, pueden usarse otras reacciones más selectivas tales como la reacción de un cetoaminoácido no natural con hidrazidas o compuestos de aminooxi, *in vitro* e *in vivo*. Véase, por ejemplo, Cornish, y col., (1996) J. Am. Chem. Soc., 118: 8150-8151; Mahal, y col., (1997) Science 276: 1125-1128; Wang, y col., (2001) Science 292: 498-500; Chin, y col., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124: 9026-9027; Chin, y col., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99: 11020-11024; Wang, y col., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100: 56-61; Zhang, y col., (2003) Biochemistry, 42: 6735-6746; y Chin, y col., (2003) Science, 301: 964-7. Esto permite el marcaje selectivo de prácticamente cualquier proteína con una serie de reactivos incluyendo fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacáridos y moléculas citotóxicas. Véase también la Patente de Estados Unidos N° 6.927.042 titulada "Glycoprotein synthesis". También pueden realizarse modificaciones postraduccionales, incluyendo pero sin limitación, a través de un azido aminoácido, a través de la ligación de Staudinger (incluyendo, pero sin limitación, con reactivos de triarilfosfina). Véase, por ejemplo, Kiick y col., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99: 19-24.

La presente divulgación proporciona otro procedimiento altamente eficaz para la modificación selectiva de proteínas, que implica la incorporación genética de aminoácidos no naturales incluyendo, pero sin limitación, los que contienen un resto de azida o alquínilo en proteínas en respuesta a un codón selector. Estas cadenas laterales de aminoácidos pueden después modificarse por, incluyendo pero sin limitación, una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] (véase, por ejemplo, Padwa, A. en Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4. (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; y Huisgen, R. en 1.3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, Nueva York, p. 1-176) con, incluyendo pero sin limitación, derivados de alquínilo o azida, respectivamente. Debido a que

este procedimiento implica una cicloadición en lugar de una sustitución nucleófila, las proteínas pueden modificarse con selectividad extremadamente alta. Esta reacción puede llevarse a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas con excelente regioselectividad ($1,4 > 1,5$) mediante la adición de cantidades catalíticas de sales de Cu(I) a la mezcla de reacción. Véase, por ejemplo, Tornøe, y col., (2002) *J. Org. Chem.* 67: 3057-3464; y Rostovtsev, y col., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 2596-2599. Otro procedimiento que puede usarse es el intercambio de ligando en un compuesto biarsénico con un motivo de tetracisteína, véase, por ejemplo, Griffin, y col., (1998) *Science* 281: 269-272.

Una molécula que puede añadirse a una proteína de la invención a través de una cicloadición [3+2] incluye prácticamente cualquier molécula con un derivado de azida o alquínilo. Las moléculas incluyen, pero sin limitación, colorantes, fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacáridos, polímeros (incluyendo pero sin limitación, derivados de polietilenglicol), fotorreticuladores, compuestos citotóxicos, marcadores de afinidad, derivados de biotina, resinas, perlas, una segunda proteína o polipéptido (o más), uno o más polinucleótidos (incluyendo, pero sin limitación, ADN, ARN, etc.), quelantes metálicos, cofactores, ácidos grasos, carbohidratos, y similares. Estas moléculas pueden añadirse a un aminoácido no natural con un grupo alquínilo, incluyendo pero sin limitación, p-propargiloxifenilalanina, o grupo azido, incluyendo pero sin limitación, p-azido-fenilalanina, respectivamente.

V. Generación *in vivo* de polipéptidos de FGF-21 que comprenden aminoácidos no codificados de forma natural

Los polipéptidos de FGF-21 de la invención pueden generarse *in vivo* usando ARNt y ARNt sintetizadas modificadas para añadir o sustituir aminoácidos que no están codificados en sistemas de origen natural.

Se describen procedimientos para generar ARNt y ARNt sintetizadas que usan aminoácidos que no están codificados en sistemas de origen natural en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 7.045.337 y 7.083.970. Estos procedimientos implican generar una maquinaria de traducción que actúa independientemente de las sintetizadas y ARNt endógenos del sistema de traducción (y se denominan, por lo tanto, en ocasiones "ortogonales"). Típicamente, el sistema de traducción comprende un ARNt ortogonal (ARNt-O) y una aminoacil ARNt sintetizada ortogonal (RS-O). Típicamente, la RS-O preferentemente aminoacila el ARNt-O con al menos un aminoácido de origen no natural en el sistema de traducción y el ARNt-O reconoce al menos un codón selector que no se reconoce por otros ARNt en el sistema. El sistema de traducción inserta por lo tanto el aminoácido no codificado de forma natural en una proteína producida en el sistema, en respuesta a un codón selector codificado, "sustituyendo" de este modo un aminoácido en una posición en el polipéptido codificado.

Se ha descrito una amplia diversidad de ARNt ortogonales y aminoacil ARNt sintetizadas en la técnica para insertar aminoácidos sintéticos particulares en polipéptidos, y generalmente son adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, se describen ARNt-O/aminoacil-ARNt sintetizadas cetoespecíficas en Wang, L., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 56-61 (2003) y Zhang, Z. y col., *Biochem.* 42(22): 6735-6746 (2003). Se codifican RS-O ejemplares, o partes de las mismas, por secuencias polinucleotídicas e incluyen secuencias de aminoácidos desveladas en las Patentes de Estados Unidos N° 7.045.337 y 7.083.970. También se describen moléculas de ARNt-O correspondientes para su uso con las RS-O en las Patentes de Estados Unidos N° 7.045.337 y 7.083.970. Se describen ejemplos adicionales de pares ARNt-O/aminoacil-ARNt sintetizadas en los documentos WO 2005/007870, WO 2005/007624 y WO 2005/019415.

Se describe un ejemplo de un sistema de ARNt-O/aminoacil-ARNt sintetizada específico de azida en Chin, J. W., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 124: 9026-9027 (2002). Las secuencias de RS-O ejemplares para p-azido-L-Phe incluyen, pero sin limitación, las secuencias de nucleótidos SEC ID N°: 14-16 y 29-32 y las secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 46-48 y 61-64 como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 7.083.970. Las secuencias de ARNt-O ejemplares adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, secuencias de nucleótidos SEC ID N°: 1-3 como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 7.083.970). Otros ejemplos de pares de ARNt-O/aminoacil-ARNt sintetizada específicos para aminoácidos particulares no codificados de forma natural se describen en la Patente de Estados Unidos N° 7.045.337. Se describen RS-O y ARNt-O que incorporan aminoácidos que contienen tanto ceto como azida en *S. cerevisiae* en Chin, J. W., y col., *Science* 301: 964-967 (2003).

Se han presentado varios otros pares ortogonales. Se han descrito sistemas de glutaminilo (véase, por ejemplo, Liu, D. R., y Schultz, P. G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 4780-4785), aspartilo (véase, por ejemplo, Pastrnak, M., y col., (2000) *Helv. Chim. Acta* 83: 2277-2286), y tirosilo (véase, por ejemplo, Ohno, S., y col., (1998) *J. Biochem. (Tokyo, Jpn.)* 124: 1065-1068; y Kowal, A. K., y col., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 2268-2273) derivados de ARNt y sintetizadas de *S. cerevisiae* para la incorporación potencial de aminoácidos no naturales en *E. coli*. Se han descrito sistemas derivados de glutaminil (véase, por ejemplo, Kowal, A. K., y col., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 2268-2273) y tirosil (véase, por ejemplo, Edwards, H., y Schimmel, P. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 1633-1641) sintetizadas de *E. coli* para su uso en *S. cerevisiae*. El sistema de tirosilo de *E. coli* se ha usado para la incorporación de 3-yodo-L-tirosina *in vivo*, en células de mamífero. Véase, Sakamoto, K., y col., (2002) *Nucleic Acids Res.* 30: 4692-4699.

El uso de ARNt-O/aminoacil-ARNt sintetizadas implica la selección de un codón específico que codifica el aminoácido

no codificado de forma natural. Aunque puede usarse cualquiera codón, generalmente es deseable seleccionar un codón que se use en pocas ocasiones o nunca en la célula en la que se expresa el ARNt-O/aminoacil-ARNt sintetasa. Por ejemplo, los codones ejemplares incluyen codones sin sentido tales como codones de parada (ámbar, ocre y ópalo), codones de cuatro o más bases y otros codones de tres bases naturales que no se usan o se usan con poca frecuencia.

Puede introducirse un codón o codones selectores específicos en posiciones apropiadas en la secuencia que codifica el polinucleótido de FGF-21 usando procedimientos de mutagénesis conocidos en la técnica (incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis específica de sitio, mutagénesis de casete, mutagénesis de selección de restricción, etc.).

Se describen procedimientos para generar componentes de la maquinaria biosintética de proteínas, tales como RS-O, ARNt-O y pares ARNt-O/RS-O ortogonales que pueden usarse para incorporar un aminoácido no codificado de forma natural en Wang, L., y col., Science 292: 498-500 (2001); Chin, J. W., y col., J. Am. Chem. Soc. 124: 9026-9027 (2002); Zhang, Z. y col., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003). Se describen procedimientos y composiciones para la incorporación *in vivo* de aminoácidos no codificados de forma natural en la Patente de Estados Unidos N° 7.045.337. También se describen procedimientos para seleccionar un par ortogonal de ARNt-ARNt sintetasa para su uso en sistema de traducción *in vivo* de un organismo en las Patentes de Estados Unidos N° 7.045.337 y 7.083.970. La Publicación de PCT N° WO 04/035743 titulada "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins", describe pares de RS y ARNt ortogonales para la incorporación de cetoaminoácidos. La Publicación de PCT N° WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code", describe pares de RS y ARNt ortogonales para la incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural en células huésped eucariotas.

Los procedimientos para producir al menos una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal recombinante (RS-O) comprende: (a) generar una biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) derivadas de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un primer organismo, incluyendo pero sin limitación, un organismo procarionta, tal como *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, o similares, o un organismo eucariota; (b) seleccionar (y/o explorar) en la biblioteca de RS (opcionalmente RS mutantes) miembros que aminoacilan un ARNt ortogonal (ARNt-O) en presencia de un aminoácido no codificado de forma natural y un aminoácido natural, proporcionando de este modo un grupo de RS activas (opcionalmente mutantes); y/o (c) seleccionar (opcionalmente a través de selección negativa) el grupo para RS activas (incluyendo, pero sin limitación, RS mutantes) que preferentemente aminoacilan el ARNt-O en ausencia del aminoácido no codificado de forma natural, proporcionando de este modo dicha al menos una RS-O recombinante; en la que dicha al menos una RS-O recombinante aminoacila preferentemente el ARNt-O con el aminoácido no codificado de forma natural.

En una realización, la RS es una RS inactiva. La RS inactiva puede generarse mutando una RS activa. Por ejemplo, la RS inactiva puede generarse mutando al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6 o al menos aproximadamente 10 o más aminoácidos a diferentes aminoácidos, incluyendo pero sin limitación, alanina.

Pueden generarse bibliotecas de RS mutantes usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo pero sin limitación diseño racional basado en la estructura de RS tridimensional proteica, o mutagénesis de nucleótidos de RS en una técnica de diseño racional o aleatorio. Por ejemplo, las RS mutantes pueden generarse por mutaciones específicas de sitio, mutaciones aleatorias, mutaciones de recombinación que generan diversidad, construcciones quiméricas, diseño racional y por otros procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

En una realización de la divulgación, la selección (y/o exploración) en la biblioteca de RS (opcionalmente RS mutantes) de miembros que están activos, incluyendo pero sin limitación, que aminoacilan un ARNt ortogonal (ARNt-O) en presencia de un aminoácido no codificado de forma natural y un aminoácido natural, incluye: introducir un marcador de exploración o selección positiva, incluyendo pero sin limitación, un gen de resistencia a antibióticos, o similares, y la biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células, comprendiendo el marcador de exploración y/o selección positiva al menos un codón selector, incluyendo pero sin limitación, un codón ámbar, ocre u ópalo; cultivar la pluralidad de células en presencia de un agente de selección; identificar las células que sobreviven (o muestran una respuesta específica) en presencia del agente de selección y/o exploración suprimiendo el al menos un codón selector en el marcador de exploración o selección positiva, proporcionando de este modo un subconjunto de células seleccionadas de forma positiva que contienen el grupo de RS activas (opcionalmente mutantes). Opcionalmente, la concentración del agente de selección y/o exploración puede variarse.

En un aspecto de la divulgación, el marcador de selección positiva es un gen de cloranfenicol acetyltransferasa (CAT) y el codón selector es un codón de parada ámbar en el gen CAT. Opcionalmente, el marcador de selección positiva es un gen de β -lactamasa y el codón selector es un codón de parada ámbar en el gen de β -lactamasa. En otro aspecto de la divulgación, el marcador de exploración positiva comprende un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad (incluyendo pero sin limitación, un marcador de superficie celular).

En una realización de la divulgación, la selección o exploración negativa del grupo con respecto a RS activas (opcionalmente mutantes) que preferentemente aminoacilan el ARNt-O en ausencia del aminoácido no codificado de forma natural incluye: introducir un marcador de exploración o selección negativa con el grupo de RS activas (opcionalmente mutantes) de la selección o exploración positiva en una pluralidad de células de un segundo organismo, comprendiendo el marcador de exploración o selección negativa al menos un codón selector (incluyendo, pero sin limitación, un gen de resistencia a antibióticos, incluyendo pero sin limitación, un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)); e identificar células que sobreviven o muestran una respuesta de exploración específica en un primer medio complementado con el aminoácido no codificado de forma natural y un agente de exploración o selección, pero que no sobreviven o no muestran la respuesta específica en un segundo medio no complementado con el aminoácido no codificado de forma natural y el agente de selección o exploración, proporcionando de este modo células supervivientes o células exploradas con dicha al menos una RS-O recombinante. Por ejemplo, un protocolo de identificación de CAT opcionalmente actúa como una selección positiva y/o una exploración negativa en la determinación de recombinantes de RS-O apropiados. Por ejemplo, se replica opcionalmente un grupo de clones en placas de crecimiento que contienen CAT (que comprende al menos un codón selector) con o sin uno o más aminoácidos no codificados de forma natural. Se considera, por lo tanto, que las colonias que crecen exclusivamente en las placas que contienen aminoácidos no codificados de forma natural contienen RS-O recombinante. En un aspecto de la divulgación, la concentración del agente de selección (y/o exploración) varía. En algunos aspectos de la divulgación, el primer y segundo organismo son diferentes. Por lo tanto, el primer y/o segundo organismo opcionalmente comprende: un procarionta, un eucariota, un mamífero, una *Escherichia coli*, un hongo, una levadura, una arqueobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc. En otras realizaciones de la divulgación, el marcador de exploración comprende un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad.

En otra realización de la divulgación, la exploración o selección (incluyendo pero sin limitación, selección negativa) del grupo con respecto a RS activas (opcionalmente mutantes) incluye: aislar el grupo de RS mutantes activas de la etapa de selección positiva (b); introducir un marcador de exploración o selección negativa, en el que el marcador de exploración o selección negativa comprende al menos un codón selector (incluyendo, pero sin limitación, un gen marcador tóxico, incluyendo, pero sin limitación, un gen de ribonucleasa barnasa, que comprende al menos un codón selector) y el grupo de RS activas (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células de un segundo organismo; e identificar las células que sobreviven o muestran una respuesta de exploración específica en un primer medio no complementado con el aminoácido no codificado de forma natural, pero que no sobreviven o no muestran una respuesta de exploración específica en un segundo medio complementado con el aminoácido no codificado de forma natural, proporcionando de este modo células supervivientes o exploradas con la al menos una RS-O recombinante, en las que dicha al menos una RS-O recombinante es específica para el aminoácido no codificado de forma natural. En un aspecto de la divulgación, dicho al menos un codón selector comprende aproximadamente dos o más codones selectores. Tales realizaciones pueden incluir opcionalmente aquellas en las que el al menos un codón selector comprende dos o más codones selectores y en las que el primer y segundo organismo son diferentes (incluyendo, pero sin limitación, cada organismo es opcionalmente, incluyendo pero sin limitación, un procarionta, un eucariota, un mamífero, una *Escherichia coli*, un hongo, una levadura, una arqueobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc.). Además, algunos aspectos de la divulgación incluyen en los que el marcador de selección negativa comprende un gen de ribonucleasa barnasa (que comprende al menos un codón selector). Otros aspectos de la divulgación incluyen aquellos en los que el marcador de exploración comprende opcionalmente un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad. En las realizaciones de la divulgación en el presente documento, las exploraciones y/o selecciones incluyen opcionalmente variación de la rigurosidad de exploración y/o selección.

En una realización de la divulgación, los procedimientos para producir al menos una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal (RS-O) recombinante pueden comprender adicionalmente: (d) aislar dicha al menos una RS-O recombinante; (e) generar un segundo conjunto de RS-O (opcionalmente mutadas) derivadas de dicha al menos una RS-O recombinante; y, (f) repetir las etapas (b) y (c) hasta que se obtenga una RS-O mutada que comprende una capacidad para aminoacilar preferentemente el ARNt-O. Opcionalmente, se repiten las etapas (d)-(f), incluyendo pero sin limitación, al menos aproximadamente dos veces. En un aspecto de la divulgación, el segundo conjunto de RS-O mutadas derivadas de al menos una RS-O recombinante puede generarse por mutagénesis, incluyendo pero sin limitación mutagénesis aleatoria, mutagénesis específica de sitio, recombinación o una combinación de las mismas.

La rigurosidad de las etapas de selección/exploración, incluyendo pero sin limitación, la etapa de selección/exploración positiva (b), la etapa de selección/exploración negativa (c) o las etapas de exploración/selección tanto positivas como negativas (b) y (c), en los procedimientos anteriormente descritos, opcionalmente incluye variar la rigurosidad de selección/exploración. En otra realización de la divulgación, la etapa de selección/exploración positiva (b), la etapa de selección/exploración negativa (c) o las etapas de selección/exploración tanto positivas como negativas (b) y (c) comprenden usar un indicador, detectándose el indicador por separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o detectándose el indicador por luminiscencia. Opcionalmente, el indicador se presenta en una superficie celular, en una presentación de fagos o similares y se selecciona basándose en la afinidad o actividad catalítica que implica al aminoácido no codificado de forma natural o un análogo. En una realización de la divulgación, la sintetasa mutada se presenta en una superficie

celular, en una presentación de fagos o similares.

Los procedimientos para producir un ARNt ortogonal (ARNt-O) recombinante incluyen: (a) crear una biblioteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt, incluyendo, pero sin limitación, un ARNt supresor, de un primer organismo; (b) seleccionar (incluyendo pero sin limitación, seleccionar de forma negativa) o explorar la biblioteca con respecto a ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan por una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) a partir de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando de este modo un grupo de ARNt (opcionalmente mutantes); y, (c) seleccionar o explorar el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) con respecto a miembros que se aminoacilan por una RS ortogonal introducida (RS-O), proporcionando de este modo al menos un ARNt-O recombinante; en los que dicho al menos un ARNt-O recombinante reconoce un codón selector y no se reconoce eficazmente por la RS del segundo organismo y se aminoacila preferentemente por la RS-O. En algunas realizaciones de la divulgación, dicho al menos un ARNt es un ARNt supresor y/o comprende un codón de tres bases único de bases naturales y/o no naturales, o es un codón sin sentido, un codón poco común, un codón no natural, un codón que comprende al menos cuatro bases, un codón ámbar, un codón ocre, o un codón de parada ópalo. En una realización de la divulgación, la ARNt-O recombinante posee una mejora de la ortogonalidad. Se apreciará que en algunas realizaciones de la divulgación, el ARNt-O se importa opcionalmente a un primer organismo desde un segundo organismo sin la necesidad de modificación. En diversas realizaciones de la divulgación, el primer y segundo organismos son iguales o diferentes y se seleccionan opcionalmente de, incluyendo pero sin limitación, procariontas (incluyendo pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium, thermoautotrophicum*, *Escherichia coli*, *Halobacterium*, etc.), eucariotas, mamíferos, hongos, levaduras, arqueobacterias, eubacterias, plantas, insectos, protistas, etc. Adicionalmente, el ARNt recombinante se aminoacila opcionalmente por un aminoácido no codificado de forma natural, biosintetizándose el aminoácido no codificado de forma natural *in vivo* de forma natural o a través de manipulación genética. El aminoácido no codificado de forma natural se añade opcionalmente a un medio de crecimiento para al menos el primer o segundo organismo.

En un aspecto de la divulgación, la selección (incluyendo pero sin limitación, selección negativa) o exploración de la biblioteca con respecto a ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan por una aminoacil-ARNt sintetasa (etapa (b)) incluye: introducir un gen de marcador tóxico, comprendiendo el gen de marcador tóxico al menos uno de los codones selectores (o un gen que conduce a la producción de un agente tóxico o estático o un gen esencial para el organismo, comprendiendo dicho gen marcador al menos un codón selector) y la biblioteca de ARNt (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células del segundo organismo; y, seleccionar células supervivientes, conteniendo las células supervivientes el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) que comprende al menos un ARNt ortogonal o ARNt no funcional. Por ejemplo, pueden seleccionarse células supervivientes usando un ensayo de densidad celular de relación de comparación.

En otro aspecto de la divulgación, el gen de marcador tóxico puede incluir dos o más codones selectores. En otra realización de los procedimientos, el gen de marcador tóxico es un gen de ribonucleasa barnasa, donde el gen de ribonucleasa barnasa comprende al menos un codón ámbar. Opcionalmente, el gen de ribonucleasa barnasa puede incluir dos o más codones ámbar.

En una realización de la divulgación, la selección o exploración del grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) con respecto a miembros que se aminoacilan por una RS ortogonal (RS-O) introducida puede incluir: introducir un gen marcador de selección o exploración positiva, comprendiendo el gen marcador positivo un gen de resistencia a fármacos (incluyendo, pero sin limitación, gen de β -lactamasa, que comprende al menos uno de los codones selectores, tal como al menos un codón de parada ámbar) o un gen esencial para el organismo, o un gen que conduzca a la destoxificación de un agente tóxico, junto con la RS-O y el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células del segundo organismo; e identificar las células supervivientes o exploradas que han crecido en presencia de un agente de selección o exploración, incluyendo pero sin limitación, un antibiótico, proporcionando de este modo un grupo de células que poseen dicho al menos un ARNt recombinante, cuando dicho al menos un ARNt recombinante se aminoacila por la RS-O e inserta un aminoácido en un producto de traducción codificado por el gen marcador positivo, en respuesta a dicho al menos un codón selector. En otra realización de la divulgación, la concentración del agente de selección y/o exploración se varía.

Se proporcionan procedimientos para generar pares ARNt-O/RS-O específicos. Los procedimientos incluyen: (a) generar una biblioteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt de un primer organismo; (b) seleccionar o explorar de forma negativa la biblioteca con respecto a ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan por una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando de este modo un grupo de ARNt (opcionalmente mutantes); (c) seleccionar o explorar el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) con respecto a miembros que se aminoacilan por una RS ortogonal (RS-O) introducida, proporcionando de este modo al menos un ARNt-O recombinante. Dicho al menos un ARNt-O recombinante reconoce un codón selector y no se reconoce eficazmente por la RS del segundo organismo y se aminoacila preferentemente por la RS-O. El procedimiento también incluye (d) generar una biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) derivadas de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un tercer organismo; (e) seleccionar o explorar la biblioteca de RS mutantes con respecto a miembros que aminoacilan preferentemente dicho al menos un ARNt-O recombinante en presencia de un aminoácido no codificado de forma natural y un aminoácido natural, proporcionando de este modo un grupo de RS activas (opcionalmente mutantes); y, (f) seleccionar o explorar de forma negativa el grupo con respecto a RS activas (opcionalmente mutantes) que

aminoácidos preferentemente dicho al menos un ARNt-O recombinante en ausencia del aminoácido no codificado de forma natural, proporcionando de este modo dicho al menos un par de ARNt-O/RS-O específico, en el que dicho al menos un par de ARNt-O/RS-O específico comprende al menos una RS-O recombinante que es específica para el aminoácido no codificado de forma natural y dicho al menos un ARNt-O recombinante. Se incluyen pares de ARNt-O/RS-O específicos producidos por los procedimientos. Por ejemplo, el par de ARNt-O/RS-O específico puede incluir, incluyendo pero sin limitación, un par de mutARN^{Tyr}-mutTyrRS, tal como un par de mutARN^{Tyr}-SS12TyrRS, un par mutARN^{Leu}-mutLeuRS, un par mutARN^{Thr}-mutThrRS, un par mutARN^{Glu}-mutGluRS, o similares. Adicionalmente, tales procedimientos incluyen aquellos en los que el primer y tercer organismos son iguales (incluyendo, pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*).

10 También se incluyen en la presente divulgación procedimientos para seleccionar un par de ARNt ortogonal-ARNt sintetasa para su uso en un sistema de traducción *in vivo* de un segundo organismo. Los procedimientos incluyen: introducir un gen marcador, un ARNt y una aminocil-ARNt sintetasa (RS) aislados o derivados de un primer organismo en un primer conjunto de células del segundo organismo; introducir el gen marcador y el ARNt en un conjunto de células duplicadas de un segundo organismo; y, seleccionar en el primer conjunto células supervivientes que no sobrevivan en el conjunto de células duplicadas o explorar células que muestren una respuesta de exploración específica que no proporcionen dicha respuesta en el conjunto de células duplicadas, cultivándose el primer conjunto y el conjunto de células duplicadas en presencia de un agente de selección o exploración, comprendiendo las células supervivientes o exploradas el par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal para su uso en el sistema de traducción *in vivo* del segundo organismo. En una realización de la divulgación, la comparación y selección o exploración incluye un ensayo de complementación *in vivo*. La concentración del agente de selección o exploración puede variar.

Los organismos de la presente divulgación comprenden una diversidad de organismos y una diversidad de combinaciones. Por ejemplo, el primer y el segundo organismos de los procedimientos de la presente divulgación pueden ser el mismo o diferentes. En una realización de la divulgación, los organismos son opcionalmente un organismo procarionta, incluyendo pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, o similares. Como alternativa, los organismos comprenden opcionalmente un organismo eucariota, incluyendo pero sin limitación, plantas (incluyendo, pero sin limitación, plantas complejas tales como monocotiledóneas o dicotiledóneas), algas, protistas, hongos, (incluyendo, pero sin limitación, levadura, etc.), animales (incluyendo, pero sin limitación, mamíferos, insectos, artrópodos, etc.) o similares. En otra realización de la divulgación, el segundo organismo es un organismo procarionta, incluyendo pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *Halobacterium*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, o similares. Como alternativa, el segundo organismo puede ser un organismo eucariota incluyendo, pero sin limitación, una levadura, una célula animal, una célula vegetal, un hongo, una célula de mamífero o similares. En diversas realizaciones de la divulgación, el primer y segundo organismo son diferentes.

VI. Localización de aminoácidos de origen no natural en polipéptidos de FGF-21

La presente invención contempla la incorporación de uno o más aminoácidos de origen no natural en polipéptidos de FGF-21. Puede incorporarse un aminoácido de origen no natural en una posición particular que no interrumpe la actividad del polipéptido. Esto puede conseguirse haciendo sustituciones "conservativas" incluyendo, pero sin limitación, sustituyendo aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrófobos, aminoácidos voluminosos con aminoácidos voluminosos, aminoácidos hidrófilos con aminoácidos hidrófilos y/o insertando el aminoácido de origen no natural en una localización que no se requiere para la actividad.

Puede emplearse una diversidad de enfoques bioquímicos y estructurales para seleccionar los sitios deseados para sustitución con un aminoácido no codificado de forma natural dentro del polipéptido de FGF-21. Resultará fácilmente evidente para los expertos habituales en la materia que cualquier posición de la cadena polipeptídica es adecuada para selección para incorporar un aminoácido no codificado de forma natural, y la selección puede basarse en el diseño racional o por selección aleatoria con respecto a cualquier fin deseado o ninguno en particular. La selección de sitios deseados puede ser para producir una molécula de FGF-21 que tenga cualquier propiedad o actividad deseada, incluyendo pero sin limitación, agonistas, superagonistas, agonistas inversos, antagonistas, moduladores de unión al receptor, moduladores de la actividad del receptor, formación de dímeros o multímeros, sin cambios en la actividad o propiedad en comparación con la molécula nativa, o manipular cualquier propiedad física o química del polipéptido tal como solubilidad, agregación o estabilidad. Por ejemplo, las localizaciones en el polipéptido requeridas para la actividad biológica de polipéptidos de FGF-21 pueden identificarse usando análisis de mutación puntual, exploración de alanina, mutagénesis de saturación y exploración con respecto a la actividad biológica, o procedimientos de exploración homólogos conocidos en la materia. Pueden mutarse restos que son críticos para la bioactividad de FGF-21, restos que están implicados en la estabilidad farmacéutica, epítopos de anticuerpos, o restos de unión a heparina o receptor. Las Patentes de Estados Unidos N° 5.580.723; 5.834.250; 6.013.478; 6.428.954; y 6.451.561 describen procedimientos para el análisis sistemático de la estructura y función de polipéptidos tales como FGF-21 identificando dominios activos que influyen en la actividad del polipéptido con una sustancia diana. Los restos distintos de los identificados como críticos para la actividad biológica por mutagénesis de exploración de alanina u homóloga pueden ser buenos candidatos para su sustitución con un aminoácido no

codificado de forma natural dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Como alternativa, los sitios identificados como críticos para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para sustitución con un aminoácido no codificado de forma natural, dependiendo de nuevo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente realizar sustituciones seriadas en cada posición en la cadena polipeptídica con un aminoácido no codificado de forma natural y observar el efecto en las actividades del polipéptido. Resulta fácilmente evidente para los expertos habituales en la materia que cualquier medio, técnica o procedimiento para seleccionar una posición para sustitución con un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para su uso en la presente invención.

Se han recogido ya muchos datos usando los procedimientos presentados en la presente solicitud y se han descubierto sitios potenciales y beneficiosos de mutación y se han ensayado de forma exitosa, como se describe en los ejemplos proporcionados posteriormente en la presente memoria descriptiva. El hallazgo de información adicional con respecto a la estructura y actividad de mutantes, incluso la que incluye algunos detalles con respecto a la formulación y/o ensayos que no se han descrito específicamente en los ejemplos, de polipéptidos de FGF-21 que contienen deleciones también puede examinarse para determinar reacciones de la proteína que son probablemente tolerantes a sustitución con un aminoácido no codificado de forma natural. De manera similar, puede usarse digestión con proteasa y anticuerpos monoclonales para identificar regiones de FGF-21 que son responsables de la unión con el receptor de FGF-21. Una vez que se han eliminado los restos que probablemente sean intolerantes a sustitución con aminoácidos no codificados de forma natural, puede examinarse el impacto de las sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes. Pueden generarse modelos a partir de las estructuras cristalinas tridimensionales de otros miembros de la familia de FGF y receptores de FGF. El Banco de Datos de Proteínas (PDB, disponible en Internet en rcsb.org) es una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de moléculas grandes de proteínas y ácidos nucleicos. Los modelos pueden realizarse investigando la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos, si no están disponibles datos estructurales tridimensionales. Por lo tanto, los expertos habituales en la materia pueden identificar fácilmente posiciones de aminoácidos que pueden sustituirse con aminoácidos no codificados de forma natural.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de FGF-21 de la invención comprenden un aminoácido de origen no natural situado en una región de la proteína que no rompe la estructura del polipéptido.

Pueden ser restos ejemplares de incorporación de un aminoácido no codificado de forma natural los que se excluyen de regiones de unión al receptor potenciales, pueden estar completa o parcialmente expuestos al disolvente, tener interacciones de enlaces de hidrógeno mínimas o nulas con restos cercanos, pueden estar expuestos mínimamente a restos reactivos cercanos, pueden estar en una o más de las caras expuestas, pueden ser un sitio o sitios que se yuxtaponen a un segundo FGF-21, u otra molécula o fragmento del mismo, pueden estar en regiones que son altamente flexibles, o estructuralmente rígidas, según se predice por la estructura tridimensional, secundaria, terciaria, o cuaternaria de FGF-21, unidos o no unidos a su receptor, o acoplados o no acoplados a otra molécula biológicamente activa, o pueden modular la conformación del FGF-21 en sí mismo o dímero o multímero que comprende uno o más FGF-21, alterando la flexibilidad o rigidez de la estructura completa según se desee.

La familia de proteínas de FGF-21 tienen una estructura de trébol β o lámina β como se identifica por cristalografía (Harmer y col., Biochemistry 43: 629-640 (2004)). Un experto habitual en la materia reconoce que dicho análisis de FGF-21 permite la determinación de los restos de aminoácidos que están expuestos en superficie en comparación con restos de aminoácidos que están internados dentro de la estructura terciaria de la proteína. Por lo tanto, es una realización de la presente invención sustituir con un aminoácido no codificado de forma natural un aminoácido que es un resto expuesto en superficie.

Se incorpora un aminoácido no codificado de forma natural en la siguiente posición en FGF-21: 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). El aminoácido de origen no natural está en la posición 108 en FGF-21 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). En una realización, el aminoácido de origen no natural está en la posición 36 en FGF-21 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7).

En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural en 91 y otro aminoácido de origen no natural en una de las siguientes posiciones: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural en 91 y otro aminoácido de origen no natural en una de las siguientes posiciones: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96, y 36 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural en la posición 91 y en la posición 131 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural

125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174.

5 Un examen de la estructura cristalina de FGF-21 o un miembro o miembros de la familia de FGF y su interacción con el receptor de FOP puede indicar cuáles de ciertos restos de aminoácidos tienen cadenas laterales que son completa o parcialmente accesibles al disolvente. La cadena lateral de un aminoácido no codificado de forma natural en estas posiciones puede apuntar en sentido contrario a la superficie proteica y fuera hacia el disolvente. El aminoácido de origen no natural de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEC ID N: 2-7). En algunas realizaciones, el aminoácido de origen no natural en dos o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo pero sin limitación, las posiciones: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). En algunas realizaciones, el aminoácido de origen no natural en una o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo pero sin limitación, las posiciones: 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 y 110 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). En algunas realizaciones, el aminoácido de origen no natural en una o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua: 10, 52, 77, 117, 126, 131, 162, (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). En algunas realizaciones, el aminoácido de origen no natural en una o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua: 87, 77, 83, 72 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). En algunas realizaciones, el aminoácido de origen no natural en una o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua: 69, 79, 91, 96, 108 y 110 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). En algunas realizaciones, el aminoácido de origen no natural en una o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua: 91, 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96, y 36 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). En otra realización, cuando aparece un aminoácido de origen no natural en el aminoácido 91 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7), el aminoácido de origen no natural se une a un polímero soluble en agua.

35 En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural en 91 ligado a un polímero en agua y otro aminoácido de origen no natural en una de las siguientes posiciones y estos aminoácidos de origen no natural se unen a un polímero soluble en agua: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural en 91 y uno o más aminoácidos de origen no natural distintos en una de las siguientes posiciones y estos aminoácidos de origen no natural se unen a un polímero soluble en agua: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96, y 36 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural en 91 unido a un polímero soluble en agua y uno o más aminoácidos de origen no natural distintos en una de las siguientes posiciones y estos aminoácidos de origen no natural se unen a un polímero soluble en agua: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural en 91 unido a un polímero soluble en agua y uno o más aminoácidos de origen no natural que se unen a un polímero soluble en agua: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 y 36 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en las SEC ID N°: 2-7). En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural en 91 unido a un polímero soluble en agua y dos o más aminoácidos de origen no natural distintos en dos o más de las siguientes posiciones y estos aminoácidos de origen no natural se unen a un polímero soluble en agua: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,

114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). En otra realización, hay un aminoácido de origen no natural en 77 unido a un polímero soluble en agua y dos o más aminoácidos de origen no natural en dos o más de las siguientes posiciones y estos aminoácidos de origen no natural se unen a un polímero soluble en agua: 91, 131, 108, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 y 36 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7). Hay un aminoácido de origen no natural en la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes de las SEC ID N°: 2-7) unidos a un polímero soluble en agua.

Una gran diversidad de aminoácidos no codificados de forma natural pueden sustituir a, o incorporarse en, una posición dada en un polipéptido de FGF-21. En general, se selecciona un aminoácido no codificado de forma natural particular para la incorporación basándose en un examen de la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido de FGF-21 u otro miembro de la familia de FGF con su receptor, una preferencia por sustituciones conservativas (es decir, aminoácidos no codificados de forma natural basados en arilo, tales como p-acetilfenilalanina u O-propargiltirosina que sustituyen a Phe, Tyr o Trp) y la química de conjugación específica que se desea introducir en el polipéptido de FGF-21 (por ejemplo, la introducción de 4-azidofenilalanina si se desea efectuar una cicloadición de Huisgen [3+2] con un polímero soluble en agua que porta un resto alquino o la formación de un enlace amida con un polímero soluble en agua que porta un aril éster que, a su vez, incorpora un resto de fosfina).

En una realización de la divulgación, el procedimiento incluye adicionalmente incorporar en la proteína el aminoácido no natural, donde el aminoácido no natural comprende un primer grupo reactivo; y poner en contacto la proteína con una molécula (incluyendo pero sin limitación, un marcador, un colorante, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, un fotorreticulador, un radionúclido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante metálico, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de spin, un fluoróforo, un resto que contiene metal, un resto radiactivo, un grupo funcional nuevo, un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas, un resto fotoliberador, un resto excitable por radiación actínica, un resto fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, un resto que incorpora un átomo pesado, un grupo escindible químicamente, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente activo redox, un amino tioácido, un resto tóxico, un resto marcado de forma isotópica, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un grupo de intercalación, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un radionucleótido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones, o cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otro compuesto o sustancia deseable) que comprende un segundo grupo reactivo. El primer grupo reactivo reacciona con el segundo grupo reactivo para unir la molécula al aminoácido no natural a través de una cicloadición [3+2]. En una realización de la divulgación, el primer grupo reactivo es un resto alquinilo o azido y el segundo grupo reactivo es un resto azido o alquinilo. Por ejemplo, el primer grupo reactivo es el resto alquinilo (incluyendo pero sin limitación, en el aminoácido no natural p-propargiloxifenilalanina) y el segundo grupo reactivo es el resto azido. En otro ejemplo, el primer grupo reactivo es el resto azido (incluyendo, pero sin limitación, en el aminoácido no natural p-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es el resto alquinilo.

En algunas realizaciones de la divulgación, la sustitución o las sustituciones de aminoácidos no codificados de forma natural se combinarán con otras adiciones, sustituciones o deleciones dentro del polipéptido de FGF-21 para afectar a otros rasgos biológicos del polipéptido de FGF-21. En algunas realizaciones de la divulgación, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la estabilidad (incluyendo pero sin limitación, resistencia a degradación proteolítica) del polipéptido de FGF-21 o aumentar la afinidad del polipéptido de FGF-21 por su receptor. En algunas realizaciones de la divulgación, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la estabilidad farmacéutica del polipéptido de FGF-21. En algunas realizaciones de la divulgación, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la solubilidad (incluyendo pero sin limitación, cuando se expresan en *E. coli* u otras células huésped) del polipéptido de FGF-21. En algunas realizaciones de la divulgación, las adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la solubilidad del polipéptido después de expresión en *E. coli* u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones de la divulgación, los sitios se seleccionan para sustitución con un aminoácido no natural o codificado de forma natural además de otro sitio para incorporación de un aminoácido no natural que da como resultado un aumento de la solubilidad del polipéptido después de la expresión en *E. coli* u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 comprenden otra adición, sustitución o deleción que modula la afinidad por el receptor del polipéptido de FGF-21, proteínas de unión o ligando asociado, modula la transducción de señales después de la unión con el receptor de FGF-21, modula la semivida en circulación, modula la liberación o biodisponibilidad, facilita la purificación o mejora o altera una vía particular de administración. En algunas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 comprenden una adición, sustitución o deleción que aumenta la afinidad de la variante de FGF-21 por su receptor. De forma similar, los polipéptidos de FGF-21 pueden comprender secuencias de escisión

química o enzimática, secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpo (incluyendo pero sin limitación, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo, pero sin limitación, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluyendo, pero sin limitación, biotina) que mejoran la detección (incluyendo, pero sin limitación, GFP), purificación, transporte a través de tejidos o membranas celulares, liberación o activación de profármacos, reducción del tamaño de FGF-21, u otros rasgos del polipéptido.

En algunas realizaciones, la sustitución de un aminoácido no codificado de forma natural genera un antagonista de FGF-21. En algunas realizaciones, un aminoácido no codificado de forma natural se sustituye o añade en una región implicada en la unión con el receptor. En algunas realizaciones, un aminoácido no codificado de forma natural se sustituye o añade en una región implicada en la unión con heparina. En algunas realizaciones, los antagonistas de FGF-21 comprenden al menos una sustitución que provoca que FGF-21 actúe como un antagonista. En algunas realizaciones, el antagonista de FGF-21 comprende un aminoácido no codificado de forma natural unido a un polímero soluble en agua que está presente en una región de unión al receptor de la molécula de FGF-21.

1 aminoácido se sustituye con un aminoácido no codificado de forma natural. En algunos casos, el resto no codificado de forma natural se une a uno o más PEG lineales o ramificados de peso molecular más bajo, potenciando de este modo la afinidad de unión y la semivida en suero comparable con respecto a las especies unidas a un solo PEG de mayor peso molecular.

VII. Expresión en no eucariotas y eucariotas

Para obtener expresión de alto nivel de un polinucleótido de FGF-21 clonado, típicamente se subclonan polinucleótidos que codifican un polipéptido de FGF-21 de la invención en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción y, si es para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción. Se conocen promotores bacterianos adecuados por los expertos habituales en la materia y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col. y Ausubel y col.

Están disponibles sistemas de expresión bacterianos para expresar polipéptidos de FGF-21 de la invención en, incluyendo pero sin limitación, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Salmonella* (Palva y col., Gene 22: 229-235 (1983); Mosbach y col., Nature 302: 543-545 (1983)). Están disponibles en el mercado kits para tales sistemas de expresión. Se conocen por los expertos habituales en la materia sistemas de expresión eucariotas para células de mamífero, levadura y células de insecto y también están disponibles en el mercado. En casos en los que se usan ARNt ortogonales y aminoacil ARNt sintetasas (descritos anteriormente) para expresar los polipéptidos de FGF-21 de la invención, las células huésped para expresión se seleccionan basándose en su capacidad para usar los componentes ortogonales. Las células huésped ejemplares incluyen bacterias Gram-positivas (incluyendo, pero sin limitación, *B. brevis*, *B. subtilis* o *Streptomyces*) y bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), así como levadura y otras células eucariotas. Las células que comprenden pares de ARNt-O/RS-O pueden usarse como se describe en el presente documento.

Una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota de la presente divulgación proporciona la capacidad para sintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. En un aspecto, la composición incluye opcionalmente, incluyendo pero sin limitación, al menos 10 microgramos, al menos 50 microgramos, al menos 75 microgramos, al menos 100 microgramos, al menos 200 microgramos, al menos 250 microgramos, al menos 500 microgramos, al menos 1 miligramo, al menos 10 miligramos, al menos 100 miligramos, al menos un gramo o más de la proteína que comprende un aminoácido no natural, o una cantidad que puede conseguirse con procedimientos de producción de proteínas *in vivo* (en el presente documento se proporcionan detalles sobre la producción y purificación de proteínas recombinantes). En otro aspecto, la proteína está opcionalmente presente en la composición a una concentración de, incluyendo pero sin limitación, al menos 10 microgramos de proteína por litro, al menos 50 microgramos de proteína por litro, al menos 75 microgramos de proteína por litro, al menos 100 microgramos de proteína por litro, al menos 200 microgramos de proteína por litro, al menos 250 microgramos de proteína por litro, al menos 500 microgramos de proteína por litro, al menos 1 miligramo de proteína por litro o al menos 10 miligramos de proteína por litro o más en, incluyendo pero sin limitación, un lisado celular, un tampón, un tampón farmacéutico u otra suspensión líquida (incluyendo, pero sin limitación, en un volumen de, incluyendo, pero sin limitación, cualquiera de aproximadamente 1 nl a aproximadamente 100 l o más). La producción de grandes cantidades (incluyendo, pero sin limitación, mayores que las típicamente posibles con otros procedimientos, incluyendo, pero sin limitación, traducción *in vitro*) de una proteína en una célula eucariota que incluye al menos un aminoácido no natural es una característica de la invención.

Una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota de la presente divulgación proporciona la capacidad para biosintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. Por ejemplo, pueden producirse proteínas que comprenden un aminoácido no natural a una concentración de, incluyendo pero sin limitación, al menos 10 µg/litro, al menos 50 µg/litro, al menos 75 µg/litro, al menos 100 µg/litro, al menos 200 µg/litro, al menos 250 µg/litro, o al menos 500 µg/litro, al menos 1 mg/litro, al menos 2 mg/litro, al menos 3 mg/litro, al menos 4 mg/litro, al menos 5 mg/litro, al menos 6 mg/litro, al menos 7 mg/litro, al menos 8 mg/litro, al menos 9 mg/litro, al menos 10 mg/litro, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900

mg/litro, 1g/litro, 5 g/litro, 10 g/litro o más de proteína en un extracto celular, lisado celular, medio de cultivo, un tampón y/o similares.

I. Sistemas de expresión. Cultivo y aislamiento

5 Pueden expresarse polipéptidos de FGF-21 en cualquier variedad de sistemas de expresión adecuados incluyendo, por ejemplo, levadura, células de insecto, células de mamífero y bacterias. Se proporciona a continuación una descripción de los sistemas de expresión ejemplares.

10 Levadura. Como se usa en el presente documento, el término "levadura" incluye cualquiera de las diversas levaduras capaces de expresar un gen que codifique un polipéptido de FGF-21. Tales levaduras incluyen, pero sin limitación, levaduras ascospóroenas (*Endomycetales*), levaduras basidiosporóenas y levaduras que pertenecen al grupo de Hongos imperfectos (*Blastomycetes*). Las levaduras ascospóroenas se dividen en dos familias, *Spermophthoraceae* y *Saccharomycetaceae*. La segunda comprende cuatro subfamilias, *Schizosaccharomycoideae* (por ejemplo, género *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* y *Saccharomycoideae* (por ejemplo, géneros *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*). Las levaduras basidiosporóenas incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* y *Filobasidiella*. Las levaduras que pertenecen al grupo de los Hongos Imperfectos (*Blastomycetes*) se dividen en dos familias, *Sporobolomycetaceae* (por ejemplo, géneros *Sporobolomyces* y *Bullera*) y *Cryptococcaceae* (por ejemplo, género *Candida*).

15 Son de particular interés para su uso con la presente invención las especies dentro de los géneros *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* y *Candida*, incluyendo pero sin limitación, *P. pastoris*, *P. guillermondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa* y *H. polymorpha*.

20 La selección de una levadura adecuada para la expresión de polipéptidos de FGF-21 está dentro de la experiencia de un experto habitual en la materia. Al seleccionar huéspedes de levadura para expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que se ha mostrado que tienen, por ejemplo, buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica, buena capacidad de secreción, buena producción de proteína soluble y resistencia global. Las levaduras están disponibles en general de una diversidad de fuentes, incluyendo pero sin limitación, el Centro de Estirpes Genéticas de Levadura, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA).

25 La expresión "huésped de levadura" o "célula huésped de levadura" incluye levadura que puede usarse, o se ha usado, como un receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. La expresión incluye la descendencia de la célula huésped de levadura original que ha recibido los vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. Se entiende que la descendencia de una sola célula parenteral puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total al parental original, debido a mutación accidental o deliberada. La descendencia de la célula parental que sea suficientemente similar a la parental para caracterizarse por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de FGF-21, se incluye en la descendencia pretendida por esta definición.

30 Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, incluyendo repicones extracromosómicos o vectores de integración, para transformación en muchos huéspedes de levadura. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para *S. cerevisiae* (Sikorski y col., GENETICS (1989) 122: 19; Ito y col., J. BACTERIOL. (1983) 153: 163; Hinnen y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75: 1929); *C. albicans* (Kurtz y col., MOL. CELL. BIOL. (1986) 6: 142); *C. maltosa* (Kunze y col., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25: 141); *H. polymorpha* (Gleeson y col., J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132: 3459; Roggenkamp y col., MOL. GENETICS AND GENOMICS (1986) 202: 302); *K. fragilis* (Das y col., J. BACTERIOL. (1984) 158: 1165); *K. lactis* (De Louvencourt y col., J. BACTERIOL. (1983) 154: 737; Van den Berg y col., BIOTECHNOLOGY (NY) (1990) 8: 135); *P. guillermondii* (Kunze y col., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25: 141); *P. pastoris* (Patentes de Estados Unidos N° 5.324.639; 4.929.555; y 4.837.148; Cregg y col., MOL. CELL. BIOL. (1985) 5: 3376); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y col., NATURE (1982) 300: 706); e *Y. lipolytica*; *A. nidulans* (Ballance y col., BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112: 284-89; Tilburn y col., GENE (1983) 26: 205-221; y Yelton y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81: 1470-74); *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J. (1985) 4: 475-479); *T. reesia* (documento EP 0 244 234); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357).

35 Se conocen secuencias de control para vectores de levadura por los expertos habituales en la materia e incluyen, pero sin limitación, regiones promotoras de genes tales como alcohol deshidrogenasa (ADH) (documento EP 0 284 044); enolasa; glucoquinasa; glucosa-6-fosfato isomerasa; gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH); hexoquinasa; fosfofructoquinasa; 3-fosfoglicerato mutasa; y piruvato quinasa (PyK) (documento EP 0 329 203). El gen PHO5 de levadura, que codifica fosfatasa ácida, también puede proporcionar secuencias promotoras útiles (Miyanoohara y col., PROC. NATL. ACAD. SCI USA (1983) 80: 1). Otras secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura pueden incluir los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y col., J. BIOL.CHEM. (1980) 255: 12073); y otras enzimas glicolíticas, tales como piruvato descarboxilasa, triosafosfato isomerasa y fosfoglucosa isomerasa (Holland y col., BIOCHEMISTRY (1978) 17: 4900; Hess y col., J. ADV. ENZYME REG. (1969) 7: 149). Los promotores de levadura inducibles que tienen la ventaja adicional de

transcripción controlada por condiciones de crecimiento pueden incluir las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2; isocitocromo C; fosfatasa ácida; metalotioneína; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno; y enzimas responsables de utilización de maltosa y galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para su uso en expresión de levaduras en el documento EP 0 073 657.

También pueden usarse potenciadores de levadura con promotores de levadura. Además, los promotores sintéticos también pueden actuar como promotores de levadura. Por ejemplo, las secuencias de activación cadena arriba (UAS) de un promotor de levadura pueden unirse con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor de híbrido sintético. Los ejemplos de dichos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora de ADH unida a la región de activación de la transcripción de GAP. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.880.734 y 4.876.197. Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que consisten en las secuencias reguladoras de los genes ADH2, GAL4, GAL10 o PHO5, combinados con la región de activación de la transcripción de un gen de enzima glicolítica tal como GAP o PyK. Véase el documento EP 0 164 556. Además, un promotor de levadura puede incluir promotores de origen natural no procedentes de levadura que tienen la capacidad para unirse a ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción.

Otros elementos de control que pueden comprender parte de los vectores de expresión de levadura incluyen terminadores, por ejemplo, de GAPDH o los genes de enolasa (Holland y col., J. BIOL. CHEM. (1981) 256: 1385). Además, el origen de replicación del origen de plásmido 2 μ es adecuado para levadura. Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura. Véase Tschumper y col., GENE (1980) 10: 157; Kingsman y col., GENE (1979) 7: 141. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura sin la capacidad para crecer en triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Se conocen por los expertos habituales en materia procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes de levadura y típicamente incluyen, pero sin limitación, la transformación de esferoplastos o de células huésped de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Por ejemplo, la transformación de levadura puede llevarse a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en Hsiao y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76: 3829 y Van Solingen y col., J. BACT. (1977) 130: 946. Sin embargo, también pueden usarse otros procedimientos para introducir ADN en células tales como por inyección nuclear, electroporación o fusión de protoplastos como se describe en general en SAMBROOK Y COL., MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001). Las células huésped de levadura después pueden cultivarse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia.

Se conocen otros procedimientos para expresar proteínas heterólogas en células huésped de levadura por los expertos habituales en la materia. Véase, en general, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20020055169, las Patentes de Estados Unidos N° 6.361.969; 6.312.923; 6.183.985; 6.083.723; 6.017.731; 5.674.706; 5.629.203; 5.602.034; y 5.089.398; las Patentes Reexaminadas de Estados Unidos N° RE37.343 y RE35.749; las Solicitudes de Patente Publicadas de PCT WO 99/07862; WO 98/37208; y WO 98/26080; las Solicitudes de Patente Europea EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; WO 90/10277; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274; y EP 0 164 556. Véase también, Gellissen y col., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2): 79-93; Romanos y col., YEAST (1992) 8(6): 423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185: 3-7.

Las cepas huésped de levadura pueden cultivarse en fermentadores durante la etapa de amplificación usando procedimientos de fermentación semicontinuos convencionales conocidos por los expertos habituales en la materia. Los procedimientos de fermentación pueden adaptarse para responder a las diferencias en la ruta de utilización de carbono de un huésped de levadura particular o modo de control de la expresión. Por ejemplo, la fermentación de un huésped de levadura de *Saccharomyces* puede requerir un suministro de glucosa sencillo, una fuente de nitrógeno compleja (por ejemplo, hidrolisados de caseína) y suplementación con múltiples vitaminas. Por el contrario, la levadura metilotrófica *P. pastoris* puede requerir suministros de glicerol, metanol y pequeñas cantidades de minerales, pero sólo sales de amonio sencillas (nitrógeno) para un crecimiento y expresión óptimos. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.324.639; Elliott y col., J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95; y Fieschko y col., BIOTECH. BIOENG. (1987) 29: 1113.

Tales procedimientos de fermentación, sin embargo, pueden tener ciertas características comunes independientes de la cepa huésped de levadura empleada. Por ejemplo, puede añadirse un nutriente limitante del crecimiento, típicamente carbono, al fermentador durante la fase de amplificación para permitir el crecimiento máximo. Además, los procedimientos de fermentación generalmente emplean un medio de fermentación diseñado para contener cantidades adecuadas de carbono, nitrógeno, sales basales, fósforo y otros nutrientes menores (vitaminas, minerales en cantidades muy pequeñas y sales, etc.). Se describen ejemplos de medios de fermentación adecuados para su uso con *Pichia* en las Patentes de Estados Unidos N° 5.324.639 y 5.231.178. El documento WO 2005/091944 describe la expresión de FGF-21 en levadura.

Células de insecto infectadas por baculovirus. La expresión "huésped de insecto" o "célula huésped de insecto" se refiere a un insecto que puede usarse, o se ha usado, como un receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. La expresión incluye la descendencia de la célula huésped de insecto original que se ha transfectado.

Se entiende que la descendencia de una célula parental sencilla puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico total al parental original, debido a una mutación accidental o deliberada. La descendencia de la célula parental que es suficientemente similar al parental para caracterizarse por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de FGF-21, se incluye en la descendencia pretendida por esta definición.

La selección de células de insecto adecuadas para la expresión de polipéptidos de FGF-21 se conoce por los expertos habituales en la materia. Están bien descritas en la técnicas varias especies de insecto y están disponibles en el mercado incluyendo *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Al seleccionar huéspedes insectos para la expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que han mostrado que tienen, entre otros, buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica y resistencia global. Los insectos están en general disponibles de una diversidad de fuentes, incluyendo pero sin limitación, el Centro de Estirpes Genéticas de Insectos, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA).

En general, los componentes de un sistema de expresión de insectos infectados por baculovirus incluye un vector de transferencia, habitualmente un plásmido bacteriano, que contiene tanto un fragmento del genoma de baculovirus como un sitio de restricción conveniente para la inserción del gen heterólogo a expresar; un baculovirus de tipo silvestre con secuencias homólogas al fragmento específico de baculovirus en el vector de transferencia (esto posibilita la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma de baculovirus); y células huésped de insecto y medios de crecimiento apropiados. Los materiales, procedimientos y técnicas usadas en la construcción de vectores, transfección de células, selección de placas, crecimiento de células en cultivo y similares se conocen en la materia y están disponibles manuales que describen estas técnicas.

Después de insertar el gen heterólogo en el vector de transferencia, el vector y el genoma viral de tipo silvestre se transfieren a una célula huésped de insecto en la que el vector y el genoma viral recombinan. El virus recombinante empaquetado se expresa y se identifican y purifican placas recombinantes. Están disponibles en el mercado materiales y procedimientos para sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus en forma de kit de, por ejemplo, Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Estas técnicas se conocen en general por los expertos habituales en la materia y se describen completamente en SUMMERS Y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN N° 1555 (1987). Véase también, RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL Y COL., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING Y POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); y O'REILLY Y COL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

De hecho, se conoce por los expertos habituales en la materia la producción de diversas proteínas heterólogas usando sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.368.825; 6.342.216; 6.338.846; 6.261.805; 6.245.528. 6.225.060; 6.183.987; 6.168.932; 6.126.944; 6.096.304; 6.013.433; 5.965.393; 5.939.285; 5.891.676; 5.871.986; 5.861.279; 5.858.368; 5.843.733; 5.762.939; 5.753.220; 5.605.827; 5.583.023; 5.571.709; 5.516.657; 5.290.686; y los documentos WO 02/06305; WO 01/90390; WO 01/27301; WO 01/05956; WO 00/55345; WO 00/20032; WO 99/51721; WO 99/45130; WO 99/31257; WO 99/10515; WO 99/09193; WO 97/26332; WO 96/29400; WO 96/25496; WO 96/06161; WO 95/20672; WO 93/03173; WO 92/16619; WO 92/02628; WO 92/01801; WO 90/14428; WO90/10078; WO90/02566; WO 90/02186; WO 90/01556; WO 89/01038; WO 89/01037; WO 88/07082.

Se conocen en la técnica vectores que son útiles en los sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus e incluyen, por ejemplo, vectores de transferencia y expresión en insectos derivados del baculovirus virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), que es un vector de expresión viral independiente de auxiliar. Los vectores de expresión virales derivados de este sistema habitualmente usan el promotor del gen de polihedrina viral fuerte para dirigir la expresión de genes heterólogos. Véase, en general, O'Reilly Y COL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

Antes de insertar el gen ajeno en el genoma del baculovirus, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, líder (si se desea), secuencia codificante de interés y secuencia de terminación de la transcripción, típicamente se ensamblan en una construcción de sustitución intermedia (vector de transferencia). Las construcciones de sustitución intermedias se mantienen con frecuencia en un replicón, tal como un elemento cromosómico extra (por ejemplo, plásmidos) capaz de establecer el mantenimiento en un huésped, tal como bacterias. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiendo de este modo que se mantenga en un huésped adecuado para clonación y amplificación. Más específicamente, el plásmido puede contener la señal de poliadenilación de polihedrina (Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42: 177) y un gen de resistencia a ampicilina procarionota (*amp*) y origen de replicación para selección y propagación en *E. coli*.

Un vector de transferencia habitualmente usado para introducir genes ajenos en AcNPV es pAc373. También se han diseñado muchos otros vectores, conocidos por los expertos en la materia, incluyendo por ejemplo, pVL985, que altera el codón de inicio de la polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de bases cadena abajo desde el ATT. Véase Luckow y Summers, VIROLOGY 170: 31 (1989). Otros vectores disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5

(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Después de la inserción del gen heterólogo, el vector de transferencia y genoma de baculovirus de tipo silvestre se co-transfectan en una célula huésped de insecto. Se conocen en la técnica procedimientos para introducir ADN heterólogo en el sitio deseado en el virus baculovirus. Véase SUMMERS Y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN N° 1555 (1987); Smith y col., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3: 2156; Luckow y Summers, VIROLOGY (1989) 170: 31. Por ejemplo, la inserción puede ser en un gen tal como el gen de la polihedrina, por recombinación de cruce doble homólogo; la inserción también puede ser en un sitio de enzima de restricción introducido por ingeniería genética en el gen de baculovirus deseado. Véase, Miller y col., BIOESSAYS (1988) 11(4): 91.

La transfección puede conseguirse por electroporación. Véase TROTTER Y WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann y King, J. GEN. VIROL. (1989) 70: 3501. Como alternativa, pueden usarse liposomas para transfectar las células de insecto con el vector de expresión recombinante y el baculovirus. Véase, por ejemplo, Liebman y col., BIOTECHNIQUES (1999) 26(1): 36; Graves y col., BIOCHEMISTRY (1998) 37: 6050; Nomura y col., J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22): 13570; Schmidt y col., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12: 323; Siffert y col., NATURE GENETICS (1998) 18: 45; TILKINS Y COL., CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai y col., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10: 263; Dolphin y col., NATURE GENETICS (1997) 17: 491; Kost y col., GENE (1997) 190: 139; Jakobsson y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271: 22203; Rowles y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37): 22376; Reverey y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39): 23607-10; Stanley y col., J. BIOL. CHEM. (1995) 270: 4121; Sisk y col., J. VIROL. (1994) 68(2): 766; y Peng y col., BIOTECHNIQUES (1993) 14(2): 274. Los liposomas disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, Cellfectin® y Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA). Además, puede usarse transfección de fosfato cálcico. Véase TROTTER Y WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19): 5667; y Mann y King, J. GEN. VIROL. (1989) 70: 3501.

Los vectores de expresión de baculovirus habitualmente contienen un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a una ARN polimerasa de baculovirus e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que habitualmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción típicamente incluye un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor de baculovirus también puede tener un segundo dominio llamado potenciador que, si está presente, habitualmente está distante del gen estructural. Además, la expresión puede ser regulada o constitutiva.

Los genes estructurales, transcritos abundantemente en momentos tardíos en el ciclo de infección, proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias derivadas del gen que codifica la proteína de polihedro viral (FRIESEN Y COL., The Regulation of Baculovirus Gene Expression in THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); documentos EP 0 127 839 y 0 155 476) y el gen que codifica la proteína p10 (Vlak y col., J. GEN. VIROL. (1988) 69: 765).

El vector de expresión de baculovirus recién formado se empaqueta en un baculovirus recombinante infeccioso y las placas que crecen posteriormente pueden purificarse por técnicas conocidas por los expertos habituales en la materia. Véase Miller y col., BIOESSAYS (1989) 11(4): 91; SUMMERS Y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN N° 1555 (1987).

Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para infección en varias células de insecto. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes para, entre otros, *Aedes aegypti* (ATCC N° CCL-125), *Bombyx mori* (ATCC N° CRL-8910), *Drosophila melanogaster* (ATCC N° 1963), *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*. Véase Wright, NATURE (1986) 321: 718; Carbonell y col., J. VIROL. (1985) 56: 153; Smith y col., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3: 2156. Véase, en general, Fraser y col., IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25: 225. Más específicamente, las líneas celulares usadas para sistemas de vector de expresión de baculovirus habitualmente incluyen, pero sin limitación, Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (ATCC N° CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp., Cat. N° 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-368 (*Trichoplusia ni*), y High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (*Trichoplusia ni*).

Están disponibles en el mercado células y medios de cultivo para expresión directa y de fusión de polipéptidos heterólogos en un baculovirus/expresión, y se conoce en general por los expertos habituales en la materia la tecnología de cultivo celular.

E. Coli, especies de Pseudomonas y otros procariontes. Se conocen por los expertos habituales en la materia técnicas de expresión bacteriana. Está disponible una amplia diversidad de vectores para su uso en huéspedes bacterianos. Los vectores pueden ser vectores de copia única o de una multiplicidad alta o baja de copias. Los vectores pueden servir para clonación y/o expresión. En vista de la amplia bibliografía con respecto a vectores, disponibilidad comercial de muchos vectores e incluso manuales que describen vectores y sus características y mapas de restricción, no se requiere un análisis exhaustivo en el presente documento. Como se conoce bien, los vectores normalmente implican marcadores que posibilitan la selección, pudiendo proporcionar dichos marcadores

resistencia a agentes citotóxicos, prototrofia o inmunidad. Frecuentemente, está presente una pluralidad de marcadores, que proporcionan diferentes características.

Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que habitualmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción típicamente incluye un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano también puede tener un segundo dominio llamado operador, que puede solapar con un sitio de unión con ARN polimerasa adyacente en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada (inducible) negativa, puesto que una proteína represora génica puede unirse al operador e inhibir de este modo la transcripción de un gen específico. Puede producirse expresión constitutiva en ausencia de elementos reguladores negativos, tales como el operador. Además, puede conseguirse regulación positiva por una secuencia de unión con proteína activadora génica que, si está presente, está habitualmente próxima (5') a la secuencia de unión con ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora génica es la proteína activadora de catabolitos (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud y col., ANNU. REV. GENET. (1984) 18: 173]. La expresión regulada puede por lo tanto ser positiva o negativa, potenciando o reduciendo de este modo la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de rutas metabólicas proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, tales como galactosa, lactosa (lac) [Chang y col., NATURE (1977) 198: 1056] y maltosa. Los ejemplos adicionales incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como triptófano (trp) [Goeddel y col., NUC. ACIDS RES. (1980) 8: 4057; Yelverton y col., NUCL. ACIDS RES. (1981) 9: 731; Patente de Estados Unidos N° 4.738.921; Publicaciones de EP N° 036 776 y 121 775]. El sistema promotor de β -galactosidasa (bla) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes". En Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], sistemas promotores de bacteriófago lambda PL [Shimatake y col., NATURE (1981) 292: 128] y T5 [Patente de Estados Unidos N° 4.689.406] también proporciona secuencias promotoras útiles. Los procedimientos preferidos de la presente divulgación utilizan promotores fuertes, tales como el promotor de T7 para inducir polipéptidos de FGF-21 a niveles altos. Se conocen por los expertos habituales en la materia ejemplos de tales vectores e incluyen la serie pET29 de Novagen y los vectores pPOP descritos en el documento WO 99/05297. Tales sistemas de expresión producen altos niveles de polipéptidos de FGF-21 en el huésped sin afectar a la viabilidad de la célula huésped o sus parámetros de crecimiento. pET19 (Novagen) es otro vector conocido en la técnica.

Además, también actúan como promotores bacterianos promotores sintéticos que no aparecen en la naturaleza. Por ejemplo, pueden unirse secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o bacteriófago con las secuencias de los operones de otros promotores bacterianos o bacteriófagos, creando un promotor híbrido sintético [Patente de Estados Unidos N° 4.551.433]. Por ejemplo, el promotor tac es un promotor híbrido trp-lac comprendido por secuencias tanto de promotor trp como de operón lac que se regula por represor lac [Amann y col., GENE (1983) 25: 167; de Boer y cl., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80: 21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores de origen natural de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor de origen natural de origen no bacteriano también puede acoplarse con una ARN polimerasa compatible para producir altos niveles de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema de ARN polimerasa/promotor de bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema promotor acoplado [Studier y col., J. MOL. BIOL. (1986) 189: 113; Tabor y col., Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82: 1074]. Además, un promotor híbrido también puede estar comprendido por un promotor de bacteriófago y una región operadora de *E. coli* (Publicación de EP N° 267 851).

Además de una secuencia promotora operativa, un sitio de unión a ribosoma eficaz también es útil para la expresión de genes ajenos en procariontes. En *E. coli*, el sitio de unión a ribosoma se denomina la secuencia Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de inicio (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio [Shine y col., NATURE (1975) 254: 34]. Se cree que la secuencia SD promueve la unión de ARNm con el ribosoma por el emparejamiento de bases entre la secuencia SD y el extremo 3' de ARNr 16S de *E. coli* [Steitz y col. "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", en Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979)]. Para expresar genes eucariotas y genes procariontes con sitios de unión a ribosoma débil [Sambrook y col. "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

La expresión "huésped bacteriano" o "célula huésped bacteriana" se refiere a una bacteria que puede usarse o se ha usado, como un receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. El término incluye la descendencia de la célula huésped bacteriana original que se ha transfectado. Se entiende que la descendencia de una célula parental sencilla puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total a la célula parental original, debido a mutación accidental o deliberada. La descendencia de la célula parental que es suficientemente similar a la célula parental para caracterizarse por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de FGF-21, se incluye en la descendencia pretendida por esta definición.

La selección de bacterias huésped adecuadas para expresión de polipéptidos de FGF-21 se conoce por los expertos

habituales en la materia. Al seleccionar huéspedes bacterianos para expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que se ha demostrado que tienen, entre otros, buena capacidad de formación de cuerpos de inclusión, baja actividad proteolítica y resistencia global. Están disponibles en general huéspedes bacterianos de una diversidad de fuentes incluyendo, pero sin limitación, el Centro de Estirpes Bacterianas, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA); y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA). La fermentación industrial/farmacéutica generalmente usa bacterias derivadas de cepas K (por ejemplo W3110) o de bacterias derivadas de cepas B (por ejemplo BL21). Estas cepas son particularmente útiles debido a que sus parámetros de crecimiento se conocen extremadamente bien y son resistentes. Además, estas cepas no son patógenas, lo que es importante comercialmente por razones de seguridad y ambientales. Otros ejemplos de huéspedes *E. coli* adecuados incluyen, pero sin limitación, cepas de BL21, DH10B o derivados de las mismas. En otra realización de los procedimientos de la presente invención, el huésped de *E. coli* es una cepa proteasa menos que incluye, pero sin limitación, OMP- y LON-. La cepa de célula huésped puede ser una especie de *Pseudomonas*, incluyendo pero sin limitación *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*. Se sabe que *Pseudomonas fluorescens* biovar 1, designada cepa MB101, es útil para producción recombinante y está disponible para procedimientos de producción de proteínas terapéuticos. Los ejemplos de un sistema de expresión de *Pseudomonas* incluyen el sistema disponible de The Dow Chemical Company como una cepa huésped (Midland, MI disponible en Internet en dow.com).

Una vez que se ha establecido una cepa de célula huésped recombinante (es decir, la construcción de expresión se ha introducido en la célula huésped y se aíslan células huésped con la construcción de expresión apropiada), la cepa de célula huésped recombinante se cultiva en condiciones apropiadas para la producción de polipéptidos de FGF-21. Como resultará evidente para un experto en la materia, el procedimiento de cultivo de la cepa de célula huésped recombinante dependerá de la naturaleza de la construcción de expresión utilizada y de la identidad de la célula huésped. Las cepas huésped recombinantes normalmente se cultivan usando procedimientos que se conocen por los expertos habituales en la materia. Las células huésped recombinantes típicamente se cultivan en medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas y, opcionalmente, que contiene vitaminas, aminoácidos, factores de crecimiento y otros suplementos de cultivo proteínicos conocidos por los expertos habituales en la materia. El medio líquido para cultivo de células huésped puede contener opcionalmente antibióticos o antifúngicos para evitar el crecimiento de microorganismos no deseables y/o compuestos incluyendo, pero sin limitación, antibióticos para seleccionar células huésped que contienen el vector de expresión.

Las células huésped recombinantes pueden cultivarse en formatos continuos o discontinuos, con recogida de células (en el caso en el que el polipéptido de FGF-21 se acumule de forma intracelular) o recogida de sobrenadante de cultivo en formatos continuos o discontinuos. Para producción en células huésped procariotas, se prefieren cultivo discontinuo y recogida de células.

Los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención normalmente se purifican después de expresión en sistemas recombinantes. El polipéptido de FGF-21 puede purificarse a partir de células huésped o medio de cultivo por una diversidad de procedimientos conocidos en la materia. Los polipéptidos de FGF-21 producidos en células huésped bacterianas pueden ser poco solubles o insolubles (en forma de cuerpos de inclusión). En una realización de la presente invención, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos fácilmente en el polipéptido de FGF-21 que se seleccionan para el fin de aumentar la solubilidad de la proteína producida de forma recombinante utilizando los procedimientos desvelados en el presente documento así como los conocidos en la técnica. En el caso de proteína insoluble, la proteína puede recogerse de lisados de células huésped por centrifugación y pueden seguirse adicionalmente de homogeneización de las células. En el caso de proteína poco soluble, pueden añadirse compuestos que incluyen, pero sin limitación, polietilénimina (PEI) para inducir la precipitación de proteína parcialmente soluble. La proteína precipitada puede después recogerse convenientemente por centrifugación. Pueden romperse u homogeneizarse células huésped recombinantes para liberar los cuerpos de inclusión desde el interior de las células usando una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia. La rotura u homogeneización de las células huésped puede realizarse usando técnicas bien conocidas incluyendo, pero sin limitación, rotura enzimática de células, sonicación, homogeneización suave o rotura de liberación a alta presión. En una realización del procedimiento de la presente invención, se usa la técnica de liberación a alta presión para romper las células huésped de *E. coli* para liberar los cuerpos de inclusión de los polipéptidos de FGF-21. Cuando se manipulan cuerpos de inclusión de polipéptido de FGF-21, puede ser ventajoso minimizar el tiempo de homogeneización en repeticiones para maximizar la producción de cuerpos de inclusión sin pérdida debida a factores tales como solubilización, cizallamiento mecánico o proteólisis.

El polipéptido de FGF-21 insoluble o precipitado puede después solubilizarse usando cualquiera de varios agentes de solubilización adecuados conocidos en la técnica. El polipéptido de FGF-21 puede solubilizarse con urea o clorhidrato de guanidina. El volumen del polipéptido de FGF-21 solubilizado debería minimizarse de modo que puedan producirse lotes grandes usando tamaños de lotes convenientemente manejables. Este factor puede ser significativo en una situación comercial a gran escala en la que el huésped recombinante puede cultivarse en lotes que son de miles por litros de volumen. Además, cuando se prepara polipéptido de FGF-21 en una situación comercial a gran escala, en particular para usos farmacéuticos humanos, debería evitarse el uso de compuestos químicos fuertes que puedan dañar la maquinaria y el recipiente o el producto proteico en sí mismo, si es posible. Se ha mostrado en el procedimiento de la presente divulgación que el agente desnaturizante más suave urea puede usarse para solubilizar los cuerpos de inclusión de polipéptido de FGF-21 en lugar del agente desnaturizante más

fuerte clorhidrato de guanidina. El uso de urea reduce significativamente el riesgo de daño al equipamiento de acero inoxidable utilizado en el procedimiento de fabricación y purificación de polipéptido de FGF-21 mientras que solubiliza eficazmente los cuerpos de inclusión de polipéptido de FGF-21.

5 En el caso de proteína de FGF-21 soluble, el FGF-21 puede secretarse en el espacio periplásmico o en el medio de cultivo. Por ejemplo, FGF-21 se secretó en el espacio periplásmico de células W3110-B2 usando plásmidos que codifican construcciones que incluyen ocho secuencias líder diferentes, incluyendo las enumeradas en SEC ID N°: 39-44 y transformando éstas en células W3110-B2, las células se cultivaron después a 37°C hasta que la DO alcanzó aproximadamente 0,8, punto en el que se indujo la expresión con arabinosa al 0,01%. Cinco horas después se prepararon las muestras de liberación periplásmica de los cultivos y se desarrollaron en los geles (Figura 33) mostrando la expresión global (lisados totales) y secreciones periplásmicas (fracción soluble).

10 Además, FGF-21 soluble puede estar presente en el citoplasma de las células huésped. Puede desearse concentrar FGF-21 soluble antes de realizar etapas de purificación. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia para concentrar FGF-21 soluble a partir de, por ejemplo, lisados celulares o medio de cultivo. Además, pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia para romper células huésped y liberar FGF-21 soluble del citoplasma o espacio periplásmico de las células huésped.

15 Cuando se produce polipéptido de FGF-21 como una proteína de fusión, puede retirarse la secuencia de fusión. Puede conseguirse la retirada de una secuencia de fusión por escisión enzimática o química. La retirada enzimática de secuencias de fusión puede conseguirse usando procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia. La selección de enzima para retirada de la secuencia de fusión se determinará por la identidad de la fusión y las condiciones de reacción se especificarán por la secreción de enzima como resultará evidente para un experto habitual en la materia. Puede conseguirse escisión química usando reactivos químicos conocidos por los expertos habituales en la materia, incluyendo pero sin limitación, bromuro de cianógeno, TEV proteasa y otros reactivos. El polipéptido de FGF-21 escindido puede purificarse a partir de la secuencia de fusión escindida por procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia. Tales procedimientos se determinarán por la identidad y propiedades de la secuencia de fusión y el polipéptido de FGF-21, como resultará evidente para un experto habitual en la materia. Los procedimientos para purificación pueden incluir, pero sin limitación, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico o diálisis o cualquier combinación de los mismos.

20 El polipéptido de FGF-21 también puede purificarse para retirar ADN de la solución de proteína. Puede retirarse ADN por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, tal como precipitación o cromatografía de intercambio iónico, pero puede retirarse por precipitación con un agente precipitante de ácido nucleico, tal como, pero sin limitación, sulfato de protamina. El polipéptido de FGF-21 puede separarse del ADN precipitado usando procedimientos bien conocidos convencionales incluyendo, pero sin limitación, centrifugación o filtración. La retirada de moléculas de ácido nucleico del huésped es un factor importante en una situación en la que el polipéptido de FGF-21 va a usarse para tratar seres humanos y los procedimientos de la presente invención reducen el ADN de la célula huésped a niveles farmacéuticamente aceptables.

25 También pueden usarse procedimientos para fermentación a pequeña escala o a gran escala en expresión proteica, incluyendo pero sin limitación, fermentadores, matraces de agitación, biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, sistemas de cultivos de frascos rotatorios y sistemas de biorreactores de tanque con agitación. Cada uno de estos procedimientos puede realizarse en un procedimiento de modo discontinuo, semicontinuo o continuo.

30 En general pueden recuperarse polipéptidos de FGF-21 humanos de la invención usando procedimientos convencionales en la técnica. Por ejemplo, puede centrifugarse o filtrarse medio de cultivo o lisado celular para retirar residuos celulares. El sobrenadante puede concentrarse o diluirse a un volumen deseado o diafiltrarse en un tampón adecuado para acondicionar la preparación para purificación adicional. La purificación adicional de polipéptido de FGF-21 de la presente invención incluye separar formas desanidadas y cortadas del gradiente del polipéptido de FGF-21 de la forma intacta.

35 Cualquiera de los siguientes procedimientos ejemplares puede emplearse para purificación de polipéptidos de FGF-21 de la invención: cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (usando, incluyendo pero sin limitación, DEAE SEPHAROSE); cromatografía en sílice; cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC); HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, incluyendo pero sin limitación, SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía de quelado metálico; ultrafiltración/diafiltración; precipitación de etanol; precipitación de sulfato de amonio; cromatocentrado; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluyendo pero sin limitación centrado isoelectrico preparatorio), solubilidad diferencial (incluyendo pero sin limitación precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción.

40 Las proteínas de la presente invención, incluyendo pero sin limitación, proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, péptidos que comprenden aminoácidos no naturales, anticuerpos para proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, compañeros de unión para proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, etc., pueden purificarse, parcial o sustancialmente hasta homogeneidad, de acuerdo con procedimientos convencionales

conocidos y usados por los expertos en la materia. En consecuencia, pueden recuperarse polipéptidos de la invención y purificarse por cualquiera de varios procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia, incluyendo pero sin limitación, precipitación por sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido o base, cromatografía en columna, cromatografía en columna de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía del fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectina, electroforesis en gel y similares. Pueden usarse etapas de plegamiento de proteínas, según se desee, al preparar proteínas maduras correctamente plegadas. Puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de afinidad u otros procedimientos adecuados en etapas de purificación final en las que se desea alta pureza. En una realización, se usan anticuerpos preparados contra aminoácidos no naturales (o proteínas o péptidos que comprenden aminoácidos no naturales) como reactivos de purificación, incluyendo pero sin limitación, purificación basada en afinidad de proteínas o péptidos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad, según se desee, los polipéptidos se usan opcionalmente para una amplia diversidad de utilidades, incluyendo pero sin limitación, como componentes de ensayo, agentes terapéuticos, profilaxis, diagnóstico, reactivos de investigación y/o como inmunógenos para producción de anticuerpos. Pueden obtenerse anticuerpos generados contra polipéptidos de la presente invención administrando los polipéptidos o fragmentos que portan epítopos o células a un animal, preferentemente a una animal no humano, usando protocolos rutinarios. Un experto habitual en la materia podría generar anticuerpos en una diversidad de técnicas conocidas. Además, pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Los anticuerpos anteriormente descritos pueden emplearse para aislar o para identificar clones que expresan el polipéptido o para purificar los polipéptidos. También pueden emplearse anticuerpos contra polipéptidos de la presente invención para tratar enfermedades.

También pueden usarse polipéptidos de la presente invención y polinucleótidos desvelados en el presente documento como vacunas. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero que comprende inocular al mamífero un polipéptido de la presente invención, adecuado para producir respuesta inmune de linfocitos T y/o anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, linfocitos T que producen citocinas o linfocitos T citotóxicos, para proteger a dicho animal de enfermedad, si la enfermedad ya está establecida dentro del individuo o no. También puede inducirse una respuesta inmunológica en un mamífero por un procedimiento que comprende suministrar un polipéptido de la presente invención mediante un vector que dirige la expresión del polinucleótido y codificar el polipéptido *in vivo* para inducir una respuesta inmunológica tal para producir anticuerpo para proteger dicho animal de enfermedades de la divulgación. Una forma de administrar al vector es acelerándolo en las células deseadas como un revestimiento en partículas o de otro modo. Tal vector de ácido nucleico puede comprender ADN, ARN, un ácido nucleico modificado o un híbrido de ADN/ARN. Para su uso como una vacuna, se proporcionará normalmente un polipéptido o un vector de ácido nucleico como una formulación de vacuna (composición). La formulación puede comprender adicionalmente un vehículo adecuado. Puesto que un polipéptido puede descomponerse en el estómago, éste puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. La formulación de vacuna también puede incluir sistemas adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación que se conocen por los expertos habituales en la materia. La dosificación dependerá de la actividad específica de la vacuna y puede determinarse fácilmente por experimentación rutinaria.

Además de otras referencias indicadas en el presente documento, se conoce por los expertos habituales en la materia una diversidad de procedimientos de plegamiento de proteínas/purificación, incluyendo, pero sin limitación, los expuestos en R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, *Methods in Enzymology* Vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag y col. (1996) *Protein Methods*, 2ª Edición Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ, Harris y Angal, (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press en Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal, *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press en Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes, (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3ª Edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden, (1998) *Protein Purification: Principles High Resolution Methods and Applications* Segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998), *Protein Protocols on CDROM* Humana Press, NJ; y las referencias citadas en las mismas.

Una ventaja de producir una proteína o polipéptido de interés con un aminoácido no natural en una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota es que típicamente las proteínas o polipéptidos se plegarán en sus conformaciones nativas. Sin embargo, en ciertas realizaciones de la invención, los expertos en la materia reconocerán que, después de la síntesis, la expresión y/o purificación, las proteínas o péptidos pueden poseer una conformación diferente de las conformaciones deseadas de los polipéptidos relevantes. En un aspecto de la divulgación, la proteína o polipéptido expresado opcionalmente se desnaturaliza y después ser re-naturaliza. Esto se consigue utilizando procedimientos conocidos en la materia, incluyendo pero sin limitación, añadiendo una chaperonina a la proteína o polipéptido de interés, solubilizando las proteínas en un agente caotrópico tal como

guanidina HCl, utilizando proteínas disulfuro isomerasa, etc.

En general, es ocasionalmente deseable desnaturalizar y reducir polipéptidos expresados y después provocar que los polipéptidos se vuelvan a plegar en la conformación preferida. Por ejemplo, puede añadirse guanidina, urea, DTT, DTE y/o una chaperonina a un producto de traducción de interés. Se conocen procedimientos para reducir, desnaturalizar y re-naturalizar proteínas por los expertos habituales en la materia (véase, las referencias anteriores y Debinski y col. (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; y Buchner y col., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270). Debinski y col., por ejemplo, describen la desnaturalización y reducción de proteínas de cuerpos de inclusión en guanidina-DTE. Las proteínas pueden volver a plegarse en un tampón redox que contiene, incluyendo pero sin limitación, glutatión oxidado y L-arginina. Puede hacerse fluir los reactivos de replegamiento o moverse de otro modo hasta entrar en contacto con el o los polipéptidos u otro producto de expresión o viceversa.

En el caso de producción procariota de polipéptido de FGF-21, el polipéptido de FGF-21 producido de este modo puede plegarse erróneamente y por lo tanto tiene actividad biológica reducida o carece de ella. La bioactividad de la proteína puede restaurarse mediante "replegamiento". En general, el polipéptido de FGF-21 plegado erróneamente se vuelve a plegar solubilizando (cuando el polipéptido de FGF-21 también es insoluble), desplegando y reduciendo la cadena polipeptídica usando, por ejemplo, uno o más agentes caotrópicos (por ejemplo, urea y/o guanidina) y un agente reductor capaz de reducir enlaces disulfuro (por ejemplo, ditioneitol, DTT o 2-mercaptoetanol, 2-ME). A una concentración moderada de caótropo, se añade después un agente oxidante (por ejemplo, oxígeno, cistina o cistamina), que permite la reformación de enlaces disulfuro. El polipéptido de FGF-21 puede replegarse usando procedimientos convencionales conocidos en la materia tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 4.511.502, 4.511.503 y 4.512.922. El polipéptido de FGF-21 también puede coplegarse con otras proteínas para formar heterodímeros o heteromultímeros.

Después del replegamiento, el FGF-21 puede purificarse adicionalmente. La purificación de FGF-21 puede conseguirse usando una diversidad de técnicas conocidas por los expertos habituales en la materia, incluyendo cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, cromatografía de afinidad y similares o cualquier combinación de las mismas. La purificación adicional también puede incluir una etapa de secado o precipitación de la proteína purificada.

Después de la purificación, FGF-21 puede intercambiarse a diferentes tampones y/o concentrarse por cualquiera de una diversidad de procedimientos conocidos en la materia, incluyendo pero sin limitación, diafiltración y diálisis. El FGF-21 que se proporciona como una proteína purificada sencilla puede someterse a agregación y precipitación.

El FGF-21 purificado puede ser al menos 90% puro (como se mide por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, RP-HPLC o electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico, SDS-PAGE) o al menos 95% puro o al menos 98% puro o al menos 99% o más puro. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza del FGF-21, el FGF-21 es suficientemente puro para su uso como un producto farmacéutico para procesamiento adicional, tal como conjugación con un polímero soluble en agua tal como PEG.

Ciertas moléculas de FGF-21 pueden usarse como agentes terapéuticos en ausencia de otros principios activos o proteínas (distintos de excipientes, vehiculos y estabilizadores, albúmina sérica y similares) o pueden formar complejo con otra proteína o un polímero.

Procedimientos de purificación generales. Puede realizarse una cualquiera de una diversidad de etapas de aislamiento en el lisado celular, extracto, medio de cultivo, cuerpos de inclusión, espacio periplásmico de las células huésped, citoplasma de las células huésped u otro material, que comprende polipéptido de FGF-21 o en cualquiera de las mezclas de polipéptidos de FGF-21 resultantes de cualquier etapa de aislamiento incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC"), HPLC de fase inversa ("RP HPLC"), adsorción de lecho expandido o cualquier combinación y/o repetición de las mismas y en cualquier orden apropiado.

El equipo y otros materiales necesarios usados en la realización de las técnicas descritas en el presente documento están disponibles en el mercado. Bombas, colectores de fracciones, monitores, grabadoras y sistemas completos están disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA), BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) y Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway NJ). También están disponibles de tales compañías materiales cromatográficos que incluyen, pero sin limitación, materiales de matriz de intercambio, medios y tampones.

Puede conseguirse equilibrado y otras etapas en los procedimientos de cromatografía en columna descritos en el presente documento tales como lavado y elución, más rápidamente usando equipamiento especializado tal como una bomba. Las bombas disponibles en el mercado incluyen, pero sin limitación, HILOAD[®], Bomba P-50, Bomba Peristáltica P-1, Bomba P-901 y Bomba P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Los ejemplos de colectores de fracciones incluyen Colector de Fracciones RediFrac, Colector de Fracciones FRAC-100 y FRAC-200 y Colector de Fracciones SUPERFRAC[®] (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). También

están disponibles mezcladores para formar gradientes de concentración lineales y de pH. Los mezcladores disponibles en el mercado incluyen Mezclador de Gradiente GM-1 y Mezcladores En-Línea (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

5 El procedimiento cromatográfico puede controlarse usando cualquier monitor disponible en el mercado. Tales monitores pueden usarse para reunir información como UV, pH y conductividad. Los ejemplos de detectores incluyen Monitor UV-1,UVICORDO S II, Monitor UV-M II, Monitor UV-900, Monitor UPC-900, Monitor pH/C-900 y Monitor de Conductividad (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). De hecho, están disponibles en el mercado sistemas completos que incluyen los diversos sistemas AKTA® de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

10 En una realización de la presente divulgación, por ejemplo, el polipéptido de FGF-21 puede reducirse y desnaturalizarse desnaturalizando primero el polipéptido de FGF-21 purificado resultante en urea, seguido de dilución en tampón TRIS que contiene un agente reductor (tal como DTT) a un pH adecuado. En otra realización de la divulgación, el polipéptido de FGF-21 se desnaturaliza en urea en un intervalo de concentración de entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 9 M, seguido de dilución en tampón TRIS a un pH en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0. La mezcla de replegamiento de esta realización puede después incubarse. En una realización de la divulgación, la mezcla de replegamiento se incubaba a temperatura ambiente durante de cuatro a veinticuatro horas. La mezcla de polipéptido de FGF-21 reducida y desnaturalizada puede después aislarse o purificarse adicionalmente.

20 Como se indica en el presente documento, el pH de la primera mezcla de polipéptido de FGF-21 puede ajustarse antes de realizar cualquier etapa de aislamiento posterior. Además, la primera mezcla de polipéptido de FGF-21 o cualquier mezcla posterior del mismo puede concentrarse usando técnicas conocidas en la materia. Además, el tampón de elución que comprende la primera mezcla de polipéptido de FGF-21 o cualquier mezcla posterior del mismo puede intercambiarse por un tampón adecuado para la siguiente etapa de aislamiento usando técnicas conocidas por los expertos habituales en la materia.

25 Cromatografía de intercambio iónico. En una realización y como una etapa adicional opcional, puede realizarse cromatografía de intercambio iónico en la primera mezcla de polipéptido de FGF-21. Véase en general ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS (Nº de Cat. 18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Las columnas de intercambio iónico disponibles en el mercado incluyen Columnas HITRAP®,HIPREP® y HILOAD® (AmershamBiosciences, Piscataway, NJ). Tales columnas utilizan intercambiadores aniónicos fuertes tales como Q SEPHAROSE® de Flujo Rápido, Q SEPHAROSE® de Alto Rendimiento y Q SEPHAROSE® XL; intercambiadores catiónicos fuertes tales como SP SEPHAROSE® de Alto Rendimiento, SP SEPHAROSE® de Flujo Rápido y SP SEPHAROSE® XL; intercambiadores aniónicos débiles tales como DEAE SEPHAROSE® de Flujo Rápido; e intercambiadores catiónicos débiles tales como CM SEPHAROSE® de Flujo Rápido (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Puede realizarse cromatografía en columna de intercambio aniónico o catiónico en el polipéptido de FGF-21 en cualquier etapa del procedimiento de purificación para aislar el polipéptido de FGF-21 sustancialmente purificado. La etapa de cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse usando cualquier matriz de intercambio catiónico adecuada. Las matrices de intercambio catiónico útiles incluyen, pero sin limitación, materiales de matriz de intercambio catiónico fibrosas, porosas, no porosas, microgranulares, en perlas o reticuladas. Tales materiales de matriz de intercambio catiónico incluyen, pero sin limitación, celulosa, agarosa, dextrano, poliacrilato, polivinilo, poliestireno, sílice, poliéter o compuestos de cualquiera de los anteriores.

40 La matriz de intercambio catiónico puede ser cualquier intercambiador catiónico adecuado incluyendo intercambiadores catiónicos fuertes y débiles. Los intercambiadores catiónicos fuertes pueden permanecer ionizados durante un amplio intervalo de pH y por lo tanto, pueden ser capaces de unirse a FGF-21 durante un intervalo de pH amplio. Los intercambiadores catiónicos débiles, sin embargo, pueden perder ionización en función del pH. Por ejemplo, un intercambiador catiónico débil puede perder carga cuando el pH baja por debajo de aproximadamente pH 4 o pH 5. Los intercambiadores catiónicos fuertes adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos funcionales cargados tales como sulfopropilo (SP), metil sulfonato (S) o sulfoetilo (SE). La matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte, preferentemente que tiene un intervalo de pH de unión con FGF-21 de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 6,0. Como alternativa, el intercambiador catiónico fuerte puede tener un intervalo de pH de unión con FGF-21 de aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 5,5. La matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte que tiene un pH de unión con FGF-21 de aproximadamente 3,0. Como alternativa, la matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte, preferentemente que tiene un intervalo de pH de unión con FGF-21 de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. La matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte preferentemente que tiene un intervalo de pH de unión con FGF-21 de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 12,5. Como alternativa, el intercambiador catiónico fuerte puede tener un intervalo de pH de unión con FGF-21 de aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 12,0.

60 Antes de cargar el FGF-21, la matriz de intercambio catiónico puede equilibrarse, por ejemplo, usando varios volúmenes de columna de un ácido débil diluido, por ejemplo, cuatro volúmenes de columna de ácido acético 20 mM, pH 3. Después del equilibrado, puede añadirse el FGF-21 y la columna puede lavarse de una a varias veces, antes de la elución de FGF-21 sustancialmente purificado, usando también una solución de ácido débil tal como una

solución de ácido acético o ácido fosfórico débil. Por ejemplo, pueden usarse aproximadamente 2-4 volúmenes de columna de ácido acético 20 mM, pH 3, para lavar la columna. También pueden usarse lavados adicionales, usando por ejemplo, 2-4 volúmenes de columna de acetato sódico 0,05 M, pH 5,5 o acetato sódico 0,05 M mezclado con cloruro sódico 0,1 M, pH 5,5. Como alternativa, usando procedimientos conocidos en la técnica, la matriz de intercambio catiónico puede equilibrarse usando varios volúmenes de columna de una base débil diluida.

Como alternativa, FGF-21 sustancialmente purificado puede eluirse poniendo en contacto la matriz de intercambio catiónico con un tampón que tenga un pH o fuerza iónica suficientemente bajos para desplazar el FGF-21 de la matriz. El pH del tampón de elución puede variar de aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 6,0. Más específicamente, el pH del tampón de elución puede variar de aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 5,0. El tampón de elución puede tener un pH de aproximadamente 3,0. Además, la cantidad de tampón de elución puede variar ampliamente y generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 volúmenes de columna.

Después de la adsorción del polipéptido de FGF-21 en la matriz de intercambio catiónico, puede eluirse polipéptido de FGF-21 sustancialmente purificado poniendo en contacto la matriz con un tampón que tenga un pH o fuerza iónica suficientemente altos para desplazar el polipéptido de FGF-21 de la matriz. Los tampones adecuados para su uso en elución a pH alto de polipéptido de FGF-21 sustancialmente purificado pueden incluir, pero sin limitación, tampones de citrato, fosfato, formato, acetato, HEPES y MES que varían en concentración de al menos aproximadamente 5 mM a al menos aproximadamente 100 mM.

Cromatografía de fase inversa. Puede realizarse RP-HPLC para purificar proteínas siguiendo protocolos adecuados que se conocen por los expertos habituales en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson y col., ANAL BIOCHEM. (1982) 124: 217-230 (1982); Rivier y col., J. CHROM. (1983) 268: 112-119; Kunitani y col., J. CHROM. (1986) 359: 391-402. Puede realizarse RP-HPLC en el polipéptido de FGF-21 para aislar polipéptido de FGF-21 sustancialmente purificado. A este respecto, pueden usarse resinas derivatizadas con sílice con funcionalidades de alquilo con una amplia diversidad de longitudes, incluyendo, pero sin limitación, al menos aproximadamente C₃, a al menos aproximadamente C₃₀, al menos aproximadamente C₃ a al menos aproximadamente C₂₀ o al menos aproximadamente C₃ a al menos aproximadamente C₁₈. Como alternativa puede usarse una resina polimérica. Por ejemplo, puede usarse resina TosoHaas Amberchrome CG1000sd, que es una resina de polímero de estireno. También pueden usarse resinas poliméricas o de ciano con una amplia diversidad de longitudes de cadena de alquilo. Además, la columna de RP-HPLC puede lavarse con un disolvente tal como etanol. La columna Source RP es otro ejemplo de una columna de RP-HPLC.

Puede usarse un tampón de elución adecuado que contenga un agente de emparejamiento de iones y un modificador orgánico tal como metanol, isopropanol, tetrahidrofurano, acetonitrilo o etanol, para eluir el polipéptido de FGF-21 de la columna de RP-HPLC. Los agentes de emparejamiento de iones más habitualmente usados incluyen, pero sin limitación, ácido acético, ácido fórmico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido heptafluorobutírico, trietilamina, tetrametilamonio, tetrabutilamonio y acetato de trietilamonio. La elución puede realizarse usando uno o más gradientes o condiciones isocráticas, con condiciones de gradiente preferidas para reducir el tiempo de separación y aumentar la anchura de los picos. Otro procedimiento implica el uso de dos gradientes con diferentes intervalos de concentración de disolvente. Los ejemplos de tampones de elución adecuados para su uso en el presente documento pueden incluir, pero sin limitación, soluciones de acetato de amonio y acetonitrilo.

Técnicas de purificación de cromatografía de interacción hidrófoba. Puede realizarse cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en el polipéptido de FGF-21. Véase, en general HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS (Nº de Cat. 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Las matrices de HIC adecuadas pueden incluir, pero sin limitación, matrices alquil o aril sustituidas, tales como matrices butil, hexil, octil o fenil sustituidas incluyendo matrices de agarosa, agarosa reticulada, sefarosa, celulosa, sílice, dextrano, poliestireno, poli(metacrilato) y resinas de modo mixto, incluyendo pero sin limitación, una resina de polietilenoamina o una matriz de poli(metacrilato) butil o fenil sustituida. Las fuentes disponibles en el mercado para cromatografía en columna de interacción hidrófoba incluyen, pero sin limitación, columnas HITRAP[®], HIPREP[®] y HILOAD[®] (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

En resumen, antes de cargar, la columna de HIC puede equilibrarse usando tampones convencionales conocidos por los expertos habituales en la materia, tales como solución de ácido acético/cloruro sódico o HEPES que contiene sulfato de amonio. Puede usarse sulfato de amonio como el tampón para cargar la columna de HIC. Después de cargar el polipéptido de FGF-21, la columna puede lavarse después usando tampones y condiciones convencionales para retirar materiales no deseados pero conservando el polipéptido de FGF-21 en la columna de HIC. El polipéptido de FGF-21 puede eluirse con de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 volúmenes de columna de un tampón convencional, tal como un tampón HEPES que contiene EDTA y concentración de sulfato de amonio más baja que el tampón de equilibrio o un tampón de ácido acético/cloruro sódico, entre otros. También puede usarse un gradiente salino lineal decreciente, usando, por ejemplo, un gradiente de fosfato potásico, para eluir las moléculas de FGF-21. El eluyente puede después concentrarse, por ejemplo, por filtración tal como diafiltración o ultrafiltración. Puede utilizarse diafiltración para retirar la sal usada para eluir el polipéptido de FGF-21.

Otras técnicas de purificación. Puede realizarse otra etapa de aislamiento, usando por ejemplo, filtración en gel (GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (N° de Cat. 18-1022-18, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), cromatografía de hidroxapatita (las matrices adecuadas incluyen, pero sin limitación, HA-Ultrogel, Alta Resolución (Calbiochem), Hidroxapatita Cerámica CHT (BioRad), Hidroxapatita Bio - Gel HTP (BioRad)), HPLC, adsorción de lecho expandido, ultrafiltración, diafiltración, liofilización y similares, en la primera mezcla de polipéptido de FGF-21 o cualquier mezcla posterior del mismo, para retirar cualquier exceso de sales y para reemplazar el tampón con un tampón adecuado para la siguiente etapa de aislamiento o incluso formulación del producto farmacológico final.

El rendimiento de polipéptido de FGF-21, incluyendo polipéptido de FGF-21 sustancialmente purificado, puede controlarse en cada etapa descrita en el presente documento usando técnicas conocidas por los expertos habituales en la materia. Tales técnicas también pueden usarse para evaluar el rendimiento de polipéptido de FGF-21 sustancialmente purificado después de la última etapa de aislamiento. Por ejemplo, el rendimiento de polipéptido de FGF-21 puede controlarse usando cualquiera de varias columnas de cromatografía líquida de alta presión de fase inversa, que tienen una diversidad de longitudes de cadena de alquilo tales como ciano RP-HPLC, C₁₈ RP-HPLC, así como HPLC de intercambio catiónico y HPLC de filtración en gel.

En realizaciones específicas de la presente divulgación, el rendimiento de FGF-21 después de cada etapa de purificación puede ser de al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 99,9% o al menos aproximadamente 99,99%, del FGF-21 en el material de partida para cada etapa de purificación.

La pureza puede determinarse usando técnicas convencionales, tales como SDS-PAGE o midiendo polipéptido de FGF-21 usando ensayos de transferencia de Western y ELISA. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos policlonales frente a proteínas aisladas de fermentación de levadura de control negativo y la recuperación de intercambio catiónico. Los anticuerpos también pueden usarse para explorar con respecto a la presencia de proteínas de célula huésped contaminantes.

El material de RP-HPLC Vydac C4 (Vydac) consiste en partículas de gel de sílice, cuyas superficies portan cadenas de C₄-alquilo. La separación de polipéptido de FGF-21 de las impurezas proteínicas se basa en diferencias en la fuerza de las interacciones hidrófobas. Se realiza elución con un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. Se realiza HPLC preparatoria usando una columna de acero inoxidable (cargada de 2,8 a 3,2 litros de gel de sílice Vydac C4). El eluato de hidroxapatita Ultrogel se acidifica añadiendo ácido trifluoroacético y se carga en la columna de Vydac C4. Para lavado y elución se usan un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. Las fracciones se recogen y se neutralizan inmediatamente con tampón fosfato. Las fracciones de polipéptido de FGF-21 que están dentro de los límites de IPC se agrupan.

El material de DEAE Sepharose (Pharmacia) consiste en grupos de dietilaminoetilo (DEAE) que se unen covalentemente a la superficie de perlas de Sepharose. La unión de polipéptido de FGF-21 con los grupos DEAE se media por interacciones iónicas. El acetonitrilo y ácido trifluoroacético pasan a través de la columna sin retenerse. Después de que estas sustancias se hayan retirado por lavado, se retiran las impurezas traza lavando la columna con tampón de acetato a un pH bajo. Después la columna se lava con tampón fosfato neutro y se eluye el polipéptido de FGF-21 con un tampón con fuerza iónica aumentada. La columna se empaqueta con DEAE Sepharose de flujo rápido. El volumen de columna se ajusta para asegurar una carga polipeptídica de FGF-21 en el intervalo de 3-10 mg de polipéptido de FGF-21/ml de gel. La columna se lava con agua y tampón de equilibrio (fosfato sódico/potásico). Las fracciones agrupadas del eluato de HPLC se cargan y la columna se lava con tampón de equilibrado. Después la columna se lava con tampón de lavado (tampón de acetato sódico) seguido de lavado con tampón de equilibrado. Posteriormente, el polipéptido de FGF-21 se eluye de la columna con tampón de elución (cloruro sódico, fosfato sódico/potásico) y se recoge en una fracción sencilla de acuerdo con el perfil de elución maestro. El eluato de la Columna de DEAE Sepharose se ajusta a la conductividad especificada. La sustancia farmacológica resultante se esteriliza por filtración en frascos de Teflón y se almacena a -70°C.

Los procedimientos adicionales que pueden emplearse incluyen, pero sin limitación, etapas para retirar endotoxinas. Las endotoxinas son lipopoli-sacáridos (LPS) que se localizan en la membrana exterior de células huésped Gram negativas, tales como, por ejemplo, *Escherichia coli*. Se conocen por el experto en la materia procedimientos para reducir los niveles de endotoxinas e incluyen, pero sin limitación, técnicas de purificación, usando soportes de sílice, polvo de vidrio o hidroxapatita, cromatografía de fase inversa, de afinidad, de exclusión por tamaño, de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, una combinación de estos procedimientos y similares. Pueden requerirse modificaciones o procedimientos adicionales para retirar contaminantes tales como proteínas que migran conjuntamente del polipéptido de interés. Se conocen por el experto en la materia procedimientos para medir los niveles de endotoxinas e incluyen, pero sin limitación, ensayos de Lisado de Amebocito Limulus (LAL). El ensayo Endosafe™ -PTS es un sistema colorimétrico, de tubo único que utiliza cartuchos precargados con reactivo LAL,

sustrato cromogénico y endotoxina convencional de control junto con un espectrofotómetro portátil. Los procedimientos alternativos incluyen, pero sin limitación, un procedimiento Kinetic LAL que es turbidimétrico y usa un formato de 96 pocillos.

5 Puede usarse una amplia diversidad de métodos y procedimientos para evaluar el rendimiento y pureza de una proteína de FGF-21 que comprende uno o más aminoácidos no codificados de forma natural, incluyendo pero sin limitación, el ensayo de Bradford, SDS-PAGE, SDS-PAGE teñido con plata, SDS-PAGE teñido con Coomassie, espectrometría de masas (incluyendo pero sin limitación, MALDI-TOF) y otros procedimientos para caracterizar proteínas conocidos por el experto habitual en la materia.

10 Los procedimientos adicionales incluyen, pero sin limitación: SDS-PAGE acoplado con procedimientos de tinción de proteínas, inmunotransferencia, desorción/ionización por láser asistido por matriz-espectrometría de masas (MALDI-MS), cromatografía líquida/espectrometría de masas, centrado isoeléctrico, intercambio aniónico analítico, cromatocentrado y dicroísmo circular.

VIII. Expresión en sistemas alternativos

15 Se han empleado varias estrategias para introducir aminoácidos no naturales en proteínas en células huésped no recombinantes, células huésped mutagenizadas o en sistemas sin células. Estos sistemas son adecuados para su uso en la preparación de polipéptidos de FGF-21 de la presente invención. La derivatización de aminoácidos con cadenas laterales reactivas tales como Lys, Cys y Tyr dio como resultado la conversión de lisina a N²-acetil-lisina. La síntesis química también proporciona un procedimiento sencillo para incorporar aminoácidos no naturales. Con el reciente desarrollo de ligamiento enzimático y ligamiento químico nativo de fragmentos peptídicos, es posible preparar proteínas más grandes. Véase, por ejemplo, P. E. Dawson y S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 923 (2000). Se describe ligamiento peptídico químico y ligamiento químico nativo en la Patente de Estados Unidos N° 6.184.344, Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0138412, Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2003/0208046, documentos WO 02/098902 y WO 03/042235. Se ha usado un procedimiento biosintético general *in vitro* en el que un ARNt supresor químicamente acilado con el aminoácido no natural deseado se añade a un extracto *in vitro* capaz de soportar la biosíntesis de proteínas, para incorporar en sitios específicos más de 100 aminoácidos no naturales en una diversidad de proteínas de prácticamente cualquier tamaño. Véase, por ejemplo, V. W. Cornish, D. Mendel y P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34: 621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science* 244: 182-188 (1989); y J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8013-8014 (1989). Se ha introducido una amplia serie de grupos funcionales en proteínas para estudios de estabilidad proteica, plegamiento proteico, mecanismo enzimático y transducción de señal.

35 Se desarrolló un procedimiento *in vivo*, denominado incorporación por presión selectiva, para aprovechar la promiscuidad de sintetetasas de tipo silvestre. Véase, por ejemplo, N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder y R. Huber, *FASEB J.*, 13: 41 (1999). Una cepa auxotrófica, en la que la ruta metabólica relevante que provee a la célula un aminoácido natural particular se interrumpe, se cultiva en medio mínimo que contiene concentraciones limitadas del aminoácido natural, mientras que se reprime la transcripción del gen diana. Al comienzo de una fase de crecimiento estacionaria, se agota el aminoácido natural y se reemplaza con el análogo de aminoácido no natural. La inducción de expresión de la proteína recombinante da como resultado la acumulación de una proteína que contiene el análogo no natural. Por ejemplo, usando esta estrategia, se han incorporado o, m y p-fluorofenilalaninas en proteínas y muestran dos picos característicos en el espectro de UV que pueden identificarse fácilmente, véase, por ejemplo, C. Minks, R. Huber, L. Moroder y N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284: 29 (2000); se ha usado trifluorometiona para reemplazar metionina en la lisozima del bacteriófago T4 para estudiar su interacción con ligandos quitooligosacáridos por RMN de ¹⁹F, véase, por ejemplo, H. Dewel, E. Daub, V. Robinson y J. F. Honek, *Biochemistry*, 36: 3404 (1997); y se ha incorporado trifluoroleucina en lugar de leucina, dando como resultado aumento de la estabilidad térmica y química de una proteína de cremallera de leucina. Véase, por ejemplo, Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado y D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40: 1494 (2001). Además, se incorporan selenometionina y telurometionina en diversas proteínas recombinantes para facilitar la solución de fases en cristalografía de rayos X. Véase, por ejemplo, W. A. Hendrickson, J. R. Horton y D. M. Lemaster, *EMBO J.*, 9: 1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda y M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1: 283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskom, J. Kellermann y R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230: 788 (1995); y, N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder y R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270: 616 (1997). También se han incorporado de forma eficaz análogos de metionina con funcionalidades de alqueno o alquino, posibilitando la modificación adicional de proteínas por medios químicos. Véase, por ejemplo, J. C. van Hest y D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 428: 68 (1998); J. C. van Hest, K. L. Kiick y D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 122: 1282 (2000); y, K. L. Kiick y D. A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56: 9487 (2000); Patente de Estados Unidos N° 6.586.207; Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2002/0042097.

60 El éxito de este procedimiento depende del reconocimiento de los análogos de aminoácidos no naturales por aminoacil-ARNt sintetetasas, que, en general, requieren alta selectividad para asegurar la fidelidad de la traducción de proteínas. Un modo de expandir el alcance de este procedimiento es relajar la especificidad de sustrato de las aminoacil-ARNt sintetetasas, que se ha conseguido en un número limitado de casos. Por ejemplo, el reemplazo de

- Ala²⁹⁴ por Gly en fenilalanil-ARNt sintetasa de *Escherichia coli* (PheRS) aumenta el tamaño del bolsillo de unión a sustrato y da como resultado la acilación de ARNtPhe por p-Cl-fenilalanina (p-Cl-Phe). Véase, M. Ibba, P. Kast y H. Hennecke, *Biochemistry*, 33: 7107 (1994). Una cepa de *Escherichia coli* que alberga esta PheRS mutante permite la incorporación de p-Cl-fenilalanina o p-Br-fenilalanina en lugar de fenilalanina. Véase, por ejemplo, M. Ibba y H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364: 272 (1995); y N. Sharma, R. Furter, P. Kast y D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467: 37 (2000). De forma similar, se mostró que una mutación puntual Phe130Ser cerca del sitio de unión de aminoácidos de tiosil-ARNt sintetasa de *Escherichia coli* permitía que se incorporara azatirosina de forma más eficaz que tirosina. Véase, F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll y S. Nishimura, *J. Biol. Chem.*, 275: 40324 (2000).
- 5 Otra estrategia para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas *in vivo* es modificar sintetetasas que tienen mecanismos de corrección. Estas sintetetasas no pueden diferenciar y por lo tanto activar aminoácidos que son estructuralmente similares a los aminoácidos naturales afines. Este error se corrige en un sitio separado, que desaclila el aminoácido cargado de forma incorrecta del ARNt para mantener la fidelidad de la traducción de la proteína. Si la actividad de corrección de la sintetasa se deshabilita, los análogos estructurales que están activados de forma errónea pueden escapar a la función de edición e incorporarse. Este enfoque se ha demostrado recientemente con la valil-ARNt sintetasa (ValRS). Véase, V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel y P. Marliere, *Science*, 292: 501 (2001). ValRS puede aminoacilar incorrectamente ARNtVal con Cys, Thr o aminobutirato (Abu); estos aminoácidos no afines se hidrolizan posteriormente por el dominio de edición. Después de mutagénesis aleatoria del cromosoma de *Escherichia coli*, se seleccionó una cepa mutante de *Escherichia coli* que tiene una mutación en el sitio de edición de ValRS. Esta ValRS defectuosa para edición carga incorrectamente ARNtVal con Cys. Debido a que Abu se asemeja de forma estérica a Cys (el grupo –SH de Cys se reemplaza con –CH₃ en Abu), la ValRS mutante también incorpora Abu en proteínas cuando esta cepa mutante de *Escherichia coli* se cultiva en presencia de Abu. El análisis espectrométrico de masas muestra que aproximadamente el 24% de las valinas se reemplazan por Abu en cada posición de valina en la proteína nativa.
- 10 Los procedimientos de síntesis de fase sólida y semisintéticos también han posibilitado la síntesis de varias proteínas que contienen nuevos aminoácidos. Por ejemplo, véanse las siguientes publicaciones y referencias citadas en las mismas, que son como sigue: Crick, F.H.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192: 1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. Studies on polypeptides. XXXVI. The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment, *J. Am chem*, 88(24): 5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes, *Acc Chem Res*, 22: 47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, *J Am Chem Soc*, 109: 3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease, *Science*, 256(5054): 221-225 (1992); Chaiken, I.M. Semisynthetic peptides and proteins, *CRC Crit Rev Biochem*, 11(3): 255-301 (1981); Offord, R.E. Protein engineering by chemical means? *Protein Eng.*, 1(3): 151-157 (1987); y, Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues, *Science*, 266(5183): 243 (1994).
- 15 Se ha usado modificación química para introducir una diversidad de cadenas laterales no naturales, incluyendo cofactores, marcadores de espín y oligonucleótidos en proteínas *in vitro*. Véase, por ejemplo, Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of a hybrid sequence specific single-stranded deoxyribonuclease, *Science*, 238(4832): 1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S., Rokita, S.E. The chemical modification of enzymatic specificity, *Annu Rev Biochem*, 54: 565-595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. Chemical mutation of enzyme active sites, *Science*, 226(4674): 505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. Properties of thiol-subtilisin, *J Biol. Chem*, 243(24): 6392-6401 (1968); Polgar, L. et M.L. Bender. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *J. Am Chem Soc*, 88: 3153-3154 (1966); y, Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, *Science*, 242(4881): 1038-1040 (1988).
- 20 Como alternativa, se han usado procedimientos biosintéticos que emplean aminoacil-ARNt modificados químicamente para incorporar varias sondas biofísicas en proteínas sintetizadas *in vitro*. Véanse las siguientes publicaciones y referencias citadas en las mismas: Brunner, J. New Photolabeling and crosslinking methods, *Annu. Rev Biochem*, 62: 483-514 (1993); y, Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent prolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 83(22): 8604-8608 (1986).
- 25 Previamente, se ha demostrado que los aminoácidos no naturales pueden incorporarse en sitios específicos en proteínas *in vitro* mediante la adición de ARNt supresor aminoacilado químicamente para reacciones de síntesis proteica programadas con un gen que contiene una mutación sin sentido ámbar deseada. Usando estos enfoques, se pueden sustituir varios de los veinte aminoácidos comunes con homólogos estructurales cercanos, por ejemplo, fenilalanina con fluorofenilalanina, usando cepas auxotróficas para un aminoácido particular. Véase, por ejemplo, Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural (amino acids into proteins, *Science*, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak y col., *Science* 268: 439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Dials, E.S. Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc*, 111: 8013-8014 (1989); N. Budisa y col., *FASEB J*. 13: 41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

unnatural amino acids site-specifically into proteins, *Methods in Enz.*, vol. 202, 301-336 (1992); y, Mendel, D., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995).

5 Por ejemplo, se preparó un ARNt supresor que reconocía el codón de parada UAG y se aminoaciló químicamente con un aminoácido no natural. Se usó mutagénesis dirigida convencional para introducir el codón de parada TAG, en el sitio de interés, en el gen de la proteína. Véase, por ejemplo, Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res*, 16(3): 791-802 (1988). Cuando el ARNt supresor acilado y el gen mutante se combinaron en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*, el aminoácido no natural se incorporó en respuesta al codón UAG que proporcionó una proteína que
10 contenía ese aminoácido en la posición especificada. Los experimentos que usaron [³H]-Phe y experimentos con α -hidroxi ácidos demostraron que sólo los aminoácidos deseados se incorporan en la posición especificada por el codón UAG y que este aminoácido no se incorpora en ningún otro sitio en la proteína. Véase, por ejemplo, Noren y col, mencionado anteriormente; Kobayashi y col., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6): 425-432; y, Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*, 255(5041):
15 197-200 (1992).

Un ARNt puede aminocilarse con un aminoácido deseado por cualquier procedimiento o técnica, incluyendo pero sin limitación, aminoacilación química o enzimática.

La aminoacilación puede conseguirse por aminoacil ARNt sintetasas o por otras moléculas enzimáticas, incluyendo pero sin limitación, ribozimas. El término "ribozima" es intercambiable con "ARN catalítico". Cech y colaboradores (Cech, 1987, *Science*, 236: 1532-1539; McCorkle y col., 1987, *Concepts Biochem.* 64: 221-226) demostraron la presencia de ARN de origen natural que pueden actuar como catalizadores (ribozimas). Sin embargo, aunque sólo se ha mostrado que estos catalizadores de ARN naturales actúan en sustratos de ácido ribonucleico para escisión y corte y empalme, el reciente desarrollo de evolución artificial de ribozimas ha expandido el repertorio de catálisis a
20 diversas reacciones químicas. Los estudios han identificado moléculas de ARN que pueden catalizar enlaces de aminoacil-ARN en sus propios extremos (2')3' (Illangakere y col., 1995 *Science* 267: 643-647) y una molécula de ARN que puede transferir un aminoácido de una molécula de ARN a otra (Lohse y col., 1996, *Nature* 381: 442-444).

La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0228593 describe procedimientos para construir ribozimas y su uso en aminoacilación de ARNt con aminoácidos codificados de forma natural y no codificados de forma natural. Las formas inmovilizadas de sustrato de moléculas enzimáticas que pueden aminoacilar ARNt, incluyendo pero sin limitación, ribozimas, pueden permitir la purificación de afinidad eficaz de los productos aminoacilados. Los ejemplos de sustratos adecuados incluyen agarosa, sepharosa y perlas magnéticas. La producción y uso de una forma inmovilizada de sustrato de ribozima para aminoacilación se describe en *Chemistry and Biology* 2003, 10: 1077-1084 y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0228593.
30

Los procedimientos de aminoacilación química incluyen, pero sin limitación, los introducidos por Hecht y colaboradores (Hecht, S. M. *Acc. Chem. Res.* 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. *Biochemistry* 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 4517) y por Schultz, Chamberlin, Dougherty y otros (Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. *Science* 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8013; Bain, J. D. y col. *Nature* 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. *Chem. Biol.* 1997, 4, 740; Turcatti y col. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. y col. *Science*, 1995, 268, 439; Saks, M. E. y col. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23169; Hoshaka, T. y col. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 34) para evitar el uso de sintetasas en aminoacilación. Tales procedimientos u otros procedimientos de aminoacilación química pueden usarse para aminoacilar moléculas de ARNt.
35

45 Los procedimientos para generar ARN catalítico pueden implicar generar grupos separados de secuencias de ribozimas aleatorias, realizar evolución dirigida en los grupos, explorar los grupos con respecto a actividad de aminoacilación deseable y seleccionar secuencias de las ribozimas que muestran actividad de aminoacilación deseada.

Las ribozimas pueden comprender motivos y/o regiones que facilitan la actividad de acilación, tales como un motivo de GGU y una región con alto contenido en U. Por ejemplo, se ha indicado que las regiones con alto contenido en U pueden facilitar el reconocimiento de un sustrato de aminoácidos y un motivo GGU puede formar pares de bases con los extremos 3' de un ARNt. En combinación, el GGU y motivo y región con alto contenido en U facilitan el reconocimiento simultáneo tanto del aminoácido como del ARNt simultáneamente y, de este modo facilitan la aminoacilación del extremo 3' del ARNt.
50

55 Pueden generarse ribozimas por selección *in vitro* usando un r24mini parcialmente aleatorizado conjugado con ARN^{Asn}CCCG, seguido de obtención por ingeniería genética sistemática de una secuencia consenso hallada en los clones activos. Una ribozima ejemplar obtenida por este procedimiento se denomina "ribozima Fx3" y se describe en la Solicitud de Publicación de Estados Unidos N° 2003/0228593, actúa como un catalizador versátil para la síntesis de diversos aminoacil-ARNt cargados con aminoácidos no naturales afines.

Puede usarse inmovilización en un sustrato para permitir la purificación de afinidad eficaz de los ARNt aminoacilados. Los ejemplos de sustratos adecuados incluyen, pero sin limitación, agarosa, sepharose y perlas magnéticas. Las ribozimas pueden inmovilizarse en resinas aprovechando la estructura química del ARN, tal como el 3'-cis-diol en la ribosa de ARN que puede oxidarse con periodato para producir el dialdehído correspondiente para facilitar la inmovilización del ARN en la resina. Pueden usarse diversos tipos de resinas incluyendo resinas de hidrazida económicas en las que la aminación reductiva hace de la interacción entre la resina y la ribozima un enlace irreversible. La síntesis de aminoacil-ARNt puede facilitarse significativamente por esta técnica de aminoacilación en columna. Kourouklis y col. *Methods* 2005; 36: 239-4 describen un sistema de aminoacilación basado en columna.

El aislamiento de los ARNt aminoacilados puede conseguirse de una diversidad de maneras. Un procedimiento adecuado es eluir los ARNt aminoacilados de una columna con un tampón tal como solución de acetato sódico con EDTA 10 mM, un tampón que contiene N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-(3-ácido propanosulfónico) 50 mM, KCl 12,5 mM, pH 7,0, EDTA 10mM o simplemente agua tamponada con EDTA (pH 7,0).

Los ARNt aminoacilados pueden añadirse a reacciones de traducción para incorporar el aminoácido con el que el ARNt se aminoaciló en una posición seleccionada en un polipéptido compuesto por la reacción de traducción. Los ejemplos de sistemas de traducción en los que los ARNt aminoacilados de la presente invención pueden usarse, incluyen, pero sin limitación lisados celulares. Los lisados celulares proporcionan componentes de reacción necesarios para traducción *in vitro* de un polipéptido a partir de un ARNm de entrada. Los ejemplos de tales componentes de reacción incluyen pero sin limitación proteínas ribosomales, ARNr, aminoácidos, ARNt, GTP, ATP, factores de inicio de la traducción y elongación y factores adicionales asociados con la traducción. Adicionalmente, los sistemas de traducción pueden ser traducciones discontinuas o traducción compartimentalizada. Los sistemas de traducción discontinuos combinan componentes de reacción en un compartimento sencillo mientras que los sistemas de traducción compartimentalizados separan los componentes de reacción de traducción de los productos de reacción que pueden inhibir la eficacia de la traducción. Tales sistemas de traducción están disponibles en el mercado.

Además, puede usarse un sistema de transcripción/traducción acoplado. Los sistemas de transcripción/traducción acoplados posibilitan la transcripción de un ADN de entrada a un ARNm correspondiente, que a su vez se traduce por los componentes de reacción. Un ejemplo de una transcripción/traducción acoplada disponible en el mercado es el Sistema de Traducción Rápida (RTS, Roche Inc.). El sistema incluye una mezcla que contiene lisado de *E. coli* para proporcionar componentes traduccionales tales como ribosomas y factores de traducción. Adicionalmente se incluye una ARN polimerasa para la transcripción del ADN de entrada en un molde de ARNm para su uso en la traducción. RTS puede usar compartimentalización de los componentes de reacción por medio de una membrana interpuesta entre los compartimentos de reacción, incluyendo un compartimento de suministro/residuos y un compartimento de transcripción/traducción.

La aminoacilación de ARNt puede realizarse por otros agentes, incluyendo pero sin limitación, transferasas, polimerasas, anticuerpos catalíticos, proteínas multifuncionales y similares.

Stephan en *Scientist* 10 de octubre de 2005; páginas 30-33 describe procedimientos adicionales para incorporar aminoácidos no codificados de forma natural en proteínas. Lu y col. en *Mol Cell*. 2001 Oct; 8(4): 759-69 describen un procedimiento en el que una proteína se liga químicamente a un péptido sintético que contiene aminoácidos no naturales (ligamiento de proteína expresada).

También se han usado técnicas de microinyección para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas. Véase, por ejemplo, M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty y H. A. Lester, *Science*, 268: 439 (1995); y, D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4: 645 (2000). Se coinyectaron en un oocito de *Xenopus* dos especies de ARN preparadas *in vitro*: un ARNm que codificaba la proteína diana con un codón de parada UAG en la posición de aminoácido de interés y un ARN supresor ámbar aminoacilado con el aminoácido no natural deseado. La maquinaria de traducción del oocito inserta después el aminoácido no natural en la posición especificada por UAG. Este procedimiento ha permitido estudios de función estructural *in vivo* de proteínas de membrana integrales, que generalmente no son aptos para sistemas de expresión *in vitro*. Los ejemplos incluyen la incorporación de un aminoácido fluorescente en el receptor de taquikinina neurokinina-2 para medir distancias mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, véase, por ejemplo, G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel y A. Chollet, *L Biol. Chem.*, 271: 19991 (1996); la incorporación de aminoácidos biotinilados para identificar restos expuestos en superficie en canales iónicos, véase, por ejemplo, J. P. Gallivan, H. A. Lester y D. A. Dougherty, *Chem. Biol.*, 4: 739 (1997); el uso de análogos de tirosina enjaulados para controlar cambios conformacionales en un canal de iones en tiempo real, véase, por ejemplo, J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty y H. A. Lester, *Neuron*, 20: 619 (1998); y el uso de alfa hidroxí aminoácidos para cambiar las cadenas principales de un canal iónico para explorar sus mecanismos de apertura. Véase, por ejemplo, P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty y H. A. Lester, *Cell*, 96: 89 (1999); y, T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz y J. Yang, *Nat. Neurosci.*, 4: 239 (2001).

La capacidad para incorporar aminoácidos no naturales directamente en proteínas *in vivo* ofrece una amplia diversidad de ventajas incluyendo pero sin limitación, altos rendimientos de proteínas mutantes, facilidad técnica, el

potencial para estudiar las proteínas mutantes en células o posiblemente en organismos vivos y el uso de estas proteínas mutantes en tratamientos terapéuticos y usos de diagnóstico. La capacidad para incluir aminoácidos no naturales con distintos tamaños, acideces, nucleofilias, hidrofobicidades y otras propiedades en proteínas puede expandir en gran medida nuestra capacidad para manipular racional y sistemáticamente las estructuras de proteínas, tanto para explorar la función proteica como para crear nuevas proteínas u organismos con nuevas propiedades.

En un intento de incorporar en sitios específicos para-F-Phe, se usó un par ARN^tPhe^{CUA} supresor ámbar de levadura/fenilalanil-ARN^t sintetasa en una cepa de *Escherichia coli* auxotrófica de Phe resistente a p-F-Phe. Véase, por ejemplo, R. Furter, *Protein Sci.*, 7: 419 (1998).

También es posible obtener expresión de un polinucleótido de FGF-21 de la presente invención usando un sistema de traducción sin células (*in vitro*). Los sistemas de traducción pueden ser celulares o sin células y pueden ser procariotas o eucariotas. Los sistemas de traducción celulares incluyen, pero sin limitación, preparaciones celulares completas tales como células permeabilizadas o cultivos celulares en los que una secuencia de ácido nucleico deseada puede transferirse a ARN y el ARNm traducirse. Están disponibles en el mercado sistemas de traducción sin células y se conocen bien muchos tipos de sistemas diferentes. Los ejemplos de sistemas sin células incluyen, pero sin limitación, lisados procariotas tales como lisados de *Escherichia coli* y lisados eucariotas tales como extractos de germen de trigo, lisados de células de insecto, lisados de reticulocitos de conejo, lisados de oocitos de conejo y lisados de células humanas. Pueden preferirse extractos o lisados eucariotas cuando la proteína resultante está glucosilada, fosforilada o modificada de otro modo debido a que muchas de tales modificaciones solamente son posibles en sistemas eucariotas. Algunos de estos extractos y lisados están disponibles en el mercado (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y.). También están disponibles extractos membranosos, tales como los extractos pancreáticos caninos que contienen membranas microsomales, que son útiles para traducir proteínas secretoras. En estos sistemas, que pueden incluir ARNm como un molde (traducción *in vitro*) o ADN como un molde (transcripción y traducción *in vitro* combinadas), la síntesis *in vitro* se dirige por los ribosomas. Se ha aplicado un considerable esfuerzo al desarrollo de sistemas de expresión de proteínas sin células. Véase, por ejemplo, Kim, D.M. y J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 74: 309-316 (2001); Kim, D.M. y J.R. Swartz, *Biotechnology Letters*, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M. y J.R. Swartz, *Biotechnology Progress*, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M. y J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 180-188, (1999); y Patnaik, R. y J.R. Swartz, *Biotechniques* 24, 862-868, (1998); Patente de Estados Unidos N° 6.337.191; Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2002/0081660; documento WO 00/55353; documento WO 90/05785. Otro enfoque que puede aplicarse a la expresión de polipéptidos de FGF-21 que comprenden un aminoácido no codificado de forma natural incluye la técnica de fusión de péptido-ARNm. Véase, por ejemplo, R. Roberts y J. Szostak, *Proc. Natl Acad. Sci. (EE.UU.)* 94: 12297-12302 (1997); A. Frankel y col., *Chemistry & Biology* 10: 1043-1050 (2003). En este enfoque, un molde de ARNm unido a una puromicina se traduce a péptido en el ribosoma. Si se ha modificado una o más moléculas de ARN^t, también pueden incorporarse aminoácidos no naturales en el péptido. Después de que se ha leído el último codón de ARNm, la puromicina captura el extremo C del péptido. Si se descubre que el conjugado de ARNm-péptido resultante tiene propiedades interesantes en un ensayo *in vitro*, su identidad puede revelarse fácilmente a partir de la secuencia de ARNm. De esta manera, se pueden explorar bibliotecas de polipéptidos de FGF-21 que comprenden uno o más aminoácidos no codificados de forma natural para identificar polipéptidos que tengan propiedades deseadas. Más recientemente, se han presentado traducciones de ribosomas *in vitro* con componentes purificados que permiten la síntesis de péptidos sustituidos con aminoácidos no codificados de forma natural. Véase, por ejemplo, A. Forster y col., *Proc. Natl Acad Sci. (EE.UU.)* 100: 6353 (2003).

También pueden usarse sistemas de traducción reconstituidos. También se han usado mezclas de factores de traducción purificados de forma exitosa para traducir ARNm a proteína así como combinaciones de lisados o lisados complementados con factores de traducción purificados tales como factor de inicio-1 (IF-1), IF-2, IF-3 (α o β), factor de elongación T (EF-Tu) o factores de terminación. Los sistemas sin células también pueden ser sistemas de transcripción/traducción acoplados en los que se introduce ADN al sistema, se transcribe ARNm y el ARNm se traduce como se describe en *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel y col. editores, Wiley Interscience, 1993). El ARN transcrito en sistema de transcripción eucariota puede estar en forma de ARN heteronuclear (ARN^{hn}) o ARN maduro con extremos 5' terminales (7-metil guanosina) y cola de poli A en el extremo 3', que pueden ser una ventaja en ciertos sistemas de traducción. Por ejemplo, los ARNm protegidos se traducen con alta eficacia en el sistema de lisado de reticulocitos.

IX. Polímeros macromoleculares acoplados a polipéptidos de FGF-21

Pueden efectuarse diversas modificaciones a los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento usando las composiciones, procedimientos, técnicas y estrategias descritos en el presente documento. Estas modificaciones incluyen la incorporación de funcionalidad adicional en el componente de aminoácido no natural del polipéptido, incluyendo pero sin limitación, un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulador; un radionúclido; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo polipeptídico; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante metálico; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN, un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un

dendrímico soluble en agua; una ciclodextrina; un ácido ribonucleico inhibidor; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, un resto que contiene metal; un resto radiactivo; un grupo funcional nuevo; un grupo que interacciona covalente o no covalentemente con otras moléculas; un resto fotoliberador; un resto excitable por radiación actínica; un resto fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; un resto que incorpora un átomo pesado; un grupo escindible químicamente; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente activo redox; un aminoácido; un resto tóxico; un resto marcado de forma isotópica; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrón denso; un grupo magnético; un grupo de intercalación; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; una molécula pequeña; un punto cuántico; un nano transmisor; un radionucleótido; un radiotransmisor; un agente de captura de neutrones; o cualquier combinación de los anteriores o cualquier compuesto o sustancia deseable distinta. Como ejemplo no limitante ilustrativo de las composiciones, procedimientos, técnicas y estrategias descritos en el presente documento, la siguiente descripción se centrará en la adición de polímeros macromoleculares al polipéptido de aminoácidos no naturales con el entendimiento de que las composiciones, procedimientos, técnicas y estrategias descritos para ello también son aplicables (con modificaciones apropiadas, si fuera necesario y para las que un experto en la materia podría hacer con las divulgaciones del presente documento) para añadir otras funcionalidades, incluyendo pero sin limitación las enumeradas anteriormente.

Una amplia diversidad de polímeros macromoleculares y otras moléculas puede unirse a polipéptidos de FGF-21 de la presente invención para modular las propiedades biológicas del polipéptido de FGF-21 y/o proporcionar nuevas propiedades biológicas a la molécula de FGF-21. Estos polímeros macromoleculares pueden unirse al polipéptido de FGF-21 mediante un aminoácido codificado de forma natural, mediante un aminoácido codificado de forma no natural o cualquier sustituyente funcional de un aminoácido natural o no natural o cualquier sustituyente o grupo funcional añadido a un aminoácido natural o no natural. El peso molecular del polímero puede ser de un amplio intervalo, incluyendo pero sin limitación, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitación, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

La presente invención proporciona preparaciones sustancialmente homogéneas de conjugados polímero:proteína. "Sustancialmente homogéneo" como se usa en el presente documento significa que se observa que las moléculas de conjugado polímero:proteína son mayores que la mitad de la proteína total. El conjugado del polímero:proteína tiene actividad biológica y las presentes preparaciones de polipéptidos de FGF-21 PEGilados "sustancialmente homogéneos" proporcionados en el presente documento son las que son suficientemente homogéneas para presentar las ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo, facilidad de aplicación clínica en la predictabilidad de farmacocinética de lote a lote.

También se puede elegir preparar una mezcla de moléculas de conjugado polímero:proteína y la ventaja proporcionada en el presente documento es que puede seleccionarse la proporción de conjugado mono-polímero:proteína para incluir en la mezcla. Por lo tanto, si se desea, se puede preparar una mezcla de diversas proteínas con diversos números de restos de polímeros unidos (es decir, di-, tri-, tetra-, etc.) y combinar dichos conjugados con el conjugado mono-polímero:proteína preparado usando los procedimientos de la presente invención y tener una mezcla con una proporción predeterminada de conjugados de mono-polímero:proteína.

El polímero seleccionado puede ser soluble en agua de modo que la proteína con la que se une no precipita en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Para uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de polímeros incluyen pero sin limitación polialquil éteres y análogos con extremos protegidos por alcoxi de los mismos (por ejemplo, polioxietilenglicol, polioxietileno/propilenglicol y análogos con extremos protegidos por metoxi o epoxi de los mismos, especialmente polioxietilenglicol, conociéndose este último también como polietilenglicol o PEG); polivinilpirrolidonas; polivinilalquil éteres; polioxazolin, polialquil oxazolin y polihidroalquil oxazolin; poliácridamidas, polialquil acrilamidas y polihidroalquil acrilamidas (por ejemplo, polihidropropilmetacrilamida y derivados de la misma); polihidroalquil acrilatos; ácidos polisialícos y análogos de los mismos; secuencias de péptidos hidrófilos; polisacáridos y sus derivados, incluyendo dextrano y derivados de dextrano, por ejemplo, carboximetildextrano, dextrano sulfatos, aminodextrano; celulosa y sus derivados, por ejemplo, carboximetil celulosa, hidroxialquil celulosas; quitina y sus derivados, por ejemplo, quitosán, succinil quitosán, carboxiraetilquitina, carboximetilquitosán; ácido hialurónico y sus derivados; almidones; alginatos; condroitín sulfato; albúmina; pululano y carboximetil pululano; poliaminoácidos y derivados de los mismos, por

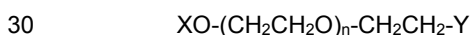
ejemplo, ácidos poliglútamicos, polilisinas, ácidos poliaspárticos, poliaspartamidas; copolímeros de anhídrido maleico tales como: copolímero de anhídrido maleico de estireno, copolímero de diviniletil éter y anhídrido maleico; alcoholes polivinílicos; copolímeros de los mismos; terpolímeros de los mismos; mezclas de los mismos; y derivados de los anteriores.

- 5 La proporción de moléculas de polietilenglicol y moléculas de proteína variará, así como sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima (con respecto a eficacia de reacción por que hay un exceso mínimo de proteína o polímero que no ha reaccionado) puede determinarse por el peso molecular del polietilenglicol seleccionado y por el número de grupos reactivos disponibles. En relación con el peso molecular, típicamente cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, menor será el número de moléculas de polímero que pueden unirse a la proteína. De forma similar, la ramificación del polímero debería tenerse en cuenta cuando se optimizan estos parámetros. En general, cuanto mayor sea el peso molecular (o haya más ramas) mayor será la relación de polímero:proteína.

- 10 Como se usa en el presente documento y cuando se contemplan conjugados de PEG:polipéptido de FGF-21, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que proporciona el beneficio deseado a un paciente. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de varios factores, incluyendo la condición física global del paciente y la causa subyacente de la afección que se tiene que tratar. La cantidad de polipéptido de FGF-21 usada para terapia proporciona una tasa aceptable de cambio y mantiene la respuesta deseada a un nivel beneficioso. Una cantidad terapéuticamente eficaz de las presentes composiciones puede determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia usando materiales y procedimientos públicamente disponibles.

- 15 El polímero soluble en agua puede ser cualquier forma estructural incluyendo pero sin limitación lineal, bifurcado o ramificado. Típicamente, el polímero soluble en agua es un poli(alquilenglicol), tal como poli(etilenglicol) (PEG), pero también pueden emplearse otros polímeros solubles en agua. Como ejemplo, se usa PEG para describir ciertas realizaciones de la presente invención.

- 20 PEG es un polímero soluble en agua bien conocido que está disponible en el mercado o puede prepararse por polimerización por apertura de anillo de etilenglicol de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia (Sandler y Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se usa ampliamente para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol, sin tener en cuenta el tamaño o la modificación en un extremo del PEG y puede representarse como unido al polipéptido de FGF-21 por la fórmula:



en la que n es 2 a 10.000 y X es H o una modificación terminal, incluyendo pero sin limitación un alquilo C₁₋₄, un grupo protector o un grupo funcional terminal.

- 35 En algunos casos, un PEG usado en la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxi, es decir, X es H o CH₃ ("metoxi PEG"). Como alternativa, el PEG puede terminar con un grupo reactivo, formando de este modo un polímero bifuncional. Los grupos reactivos típicos pueden incluir los grupos reactivos que se usan habitualmente para reaccionar con los grupos funcionales hallados en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo pero sin limitación, grupos maleimido, carbonatos activados (incluyendo pero sin limitación, p-nitrofenil éster), ésteres activados (incluyendo pero sin limitación, N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenil éster) y aldehídos) así como grupos funcionales que son inertes para los 20 aminoácidos comunes pero que reaccionan específicamente con grupos funcionales complementarios presentes en aminoácidos no identificados de forma natural (incluyendo pero sin limitación, grupos azida, grupos alquino). Se observa que el otro extremo del PEG, que se muestra en la fórmula anterior mediante Y, se unirá directa o indirectamente a un polipéptido de FGF-21 mediante un aminoácido de origen natural o no codificado de forma natural. Por ejemplo, Y puede ser un enlace de urea, amida o carbamato con un grupo amina (incluyendo pero sin limitación, la amina Epsilon de lisina o el extremo N) del polipéptido. Como alternativa, Y puede ser un enlace de maleimida con un grupo tiol (incluyendo pero sin limitación, el grupo tiol de cisteína). Como alternativa, Y puede ser un enlace con un resto no accesible habitualmente mediante los 20 aminoácidos comunes. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar un grupo azida en el PEG con un grupo alquino en el polipéptido de FGF-21 para formar un producto de cicloadición de Huisgen [3+2]. Como alternativa, puede hacerse reaccionar un grupo alquino en el PEG con un grupo azida presente en un aminoácido no codificado de forma natural para formar un producto similar. En algunas realizaciones, puede hacerse reaccionar un nucleófilo fuerte (incluyendo pero sin limitación, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, semicarbazida) con un grupo aldehído o cetona presente en un aminoácido no codificado de forma natural para formar una hidrazona, oxima o semicarbazona, según sea aplicable, que en algunos casos puede reducirse adicionalmente por tratamiento con un agente reductor apropiado. Como alternativa, el nucleófilo fuerte puede incorporarse en el polipéptido de FGF-21 mediante un aminoácido no codificado de forma natural y usarse para reaccionar preferentemente con un grupo cetona o aldehído presente en el polímero soluble en agua.

Puede usarse cualquier masa molecular para un PEG según se desee de forma práctica, incluyendo pero sin limitación, de aproximadamente 100 Daltons (Da) a 100.000 Da o más según se desee (incluyendo pero sin limitación, en ocasiones 0,1-50 kDa o 10-40 kDa). El peso molecular de PEG puede ser de un intervalo amplio,

incluyendo pero sin limitación, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 o más. El PEG puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitación, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el PEG está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el PEG está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el PEG está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el PEG está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el PEG está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. También pueden usarse PEG de cadena ramificada, incluyendo sin limitación, moléculas de PEG en las que cada cadena tiene un PM que varía de 1-100 kDa (incluyendo pero sin limitación, 1-50 kDa o 5-20 kDa). El peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada puede estar, incluyendo pero sin limitación, entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitación, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da y 1.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. Se describe una amplia serie de moléculas de PEG en, incluyendo pero sin limitación, el catálogo de Shearwater Polymers, Inc., catálogo de Nektar Therapeutics.

En general, al menos un extremo de la molécula de PEG está disponible para la reacción con el aminoácido no codificado de forma natural. Por ejemplo, pueden usarse derivados de PEG que portan restos alquino y azida para reacción con cadenas laterales de aminoácidos para unir PEG a aminoácidos no codificados de forma natural como se describe en el presente documento. Si el aminoácido no codificado de forma natural comprende una azida entonces el PEG típicamente, tendrá un resto alquino para efectuar formación del producto de cicloadición [3 + 2] o una especie de PEG activada (es decir, éster, carbonato), que contenga un grupo fosfino para efectuar la formación del enlace de amida. Como alternativa, si el aminoácido no codificado de forma natural comprende un alquino, entonces el PEG típicamente contendrá un resto azida para efectuar la formación del producto de cicloadición de Huisgen [3+2]. Si el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo carbonilo, el PEG típicamente comprenderá un nucleófilo potente (incluyendo pero sin limitación, una funcionalidad de hidrazida, hidrazina, hidroxilamina o semicarbazida) para efectuar la formación de enlaces de hidrazona, oxima y semicarbazona correspondientes, respectivamente. En otras alternativas, puede usarse una orientación inversa de los grupos reactivos descritos anteriormente, es decir, puede hacerse reaccionar un resto de azida en el aminoácido no codificado de forma natural con un derivado de PEG que contenga un alquino.

En algunas realizaciones, la variante del polipéptido de FGF-21 con un derivado de PEG contiene una funcionalidad química que es reactiva con la funcionalidad química presente en la cadena lateral de aminoácido no codificado de forma natural.

La invención proporciona en algunas realizaciones derivados de polímero que contienen azida y acetileno que comprenden una cadena principal de polímero soluble en agua que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da. La cadena principal polimérica del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol). Sin embargo, debería entenderse que una amplia diversidad de polímeros solubles en agua incluyendo pero sin limitación poli(etilenglicol) y otros polímeros relacionados, incluyendo poli(dextrano) y poli(propilenglicol), también son adecuados para su uso en la práctica de la presente invención y que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) pretende abarcar e incluir todas de tales moléculas. El término PEG incluye, pero sin limitación, poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG bifuncional, PEG con múltiples ramas, PEG derivatizado, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgante de la cadena principal polimérica) o PEG con enlaces degradables en el mismo.

PEG es típicamente transparente, incoloro, inodoro, soluble en agua, estable frente al calor, inerte para muchos agentes químicos, no hidroliza ni se deteriora y es generalmente no tóxico. Se considera que el poli (etilenglicol) es biocompatible, lo que significa que PEG es capaz de coexistir con tejidos u organismos vivos sin causarles daño. Más específicamente, PEG es sustancialmente no inmunogénico, lo que significa que PEG no tiende a producir una respuesta inmune en el cuerpo. Cuando se une a una molécula que tiene alguna función deseable en el cuerpo, tal como un agente biológicamente activo, el PEG tiende a enmascarar el agente y puede reducir o eliminar cualquier respuesta inmune de modo que un organismo puede tolerar la presencia del agente. Los conjugados de PEG no tienden a producir una respuesta inmune considerable o provocar coagulación u otros efectos no deseados. El PEG que tiene la fórmula -- CH₂CH₂O--(CH₂CH₂O)_n - CH₂CH₂--, en la que n es de aproximadamente 3 a aproximadamente 4000, típicamente de aproximadamente 20 a aproximadamente 2000, es adecuado para su uso

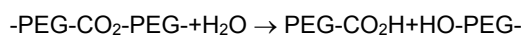
en la presente invención. El PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da es, en algunas realizaciones de la presente invención, particularmente útil como la cadena principal polimérica. El peso molecular de PEG puede ser de un intervalo amplio, incluyendo pero sin limitación, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular de PEG puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitación, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG está entre aproximadamente 1000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG está entre aproximadamente 5000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

La cadena principal polimérica puede ser lineal o ramificada. Se conocen en general en la técnica cadenas principales poliméricas ramificadas. Típicamente, un polímero ramificado tiene un resto principal de rama central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo de rama central. PEG se usa habitualmente en formas ramificadas que pueden prepararse por adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El resto de la rama central también puede obtenerse a partir de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado puede representarse en forma general como R(-PEG-OH)_m en la que R se obtiene a partir de un resto principal, tal como glicerol, oligómeros de glicerol o pentaeritritol y M representa el número de ramas. También pueden usarse moléculas de PEG con múltiples ramas, tales como las descritas en las Patentes de Estados Unidos N° 5.932.462; 5.643.575; 5.229.490; 4.289.872; Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0143596; documento WO 96/21469; y documento WO 93/21259, como la cadena principal polimérica.

El PEG ramificado también puede estar en forma de un PEG bifurcado representado por PEG(-YCHZ₂)_n, en la que Y es un grupo de enlace y Z es un grupo terminal activado unido a CH por una cadena de átomos de longitud definida.

Otra forma ramificada más, el PEG colgante, tiene grupos reactivos, tales como carboxilo, a lo largo de la cadena principal de PEG en lugar del extremo de las cadenas de PEG.

Además de estas formas de PEG, el polímero también puede prepararse con enlaces débiles o degradables en la cadena principal. Por ejemplo, puede prepararse PEG con enlaces de éster en la cadena principal polimérica que se someten a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis da como resultado escisión del polímero en fragmentos de peso molecular más bajo:



Se entiende por los expertos habituales en la materia que la expresión poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las formas conocidas en la técnica incluyendo pero sin limitación las desveladas en el presente documento.

Muchos otros polímeros también son adecuados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones, son particularmente útiles en la invención cadenas principales poliméricas que son solubles en agua, con de dos a aproximadamente 300 extremos. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, otros poli(alquilenglicoles) tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de los mismos (incluyendo pero sin limitación copolímeros de etilenglicol y propilenglicol), terpolímeros de los mismos, mezclas de los mismos y similares. Aunque el peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica puede variar, éste está típicamente en el intervalo de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, con frecuencia de aproximadamente 6.000 Da a aproximadamente 80.000 Da. El peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero sin limitación, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

Los expertos habituales en la materia reconocerán que la lista anterior para cadenas principales sustancialmente solubles en agua no es en absoluto exhaustiva y es meramente ilustrativa y que todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuados para su uso en la presente invención.

En algunas realizaciones de la presente invención, los derivados poliméricos son "multifuncionales", lo que significa que la cadena principal polimérica tiene al menos dos extremos y posiblemente hasta aproximadamente 300 extremos, funcionalizados o activados con un grupo funcional. Los derivados de polímeros multifuncionales incluyen, pero sin limitación, polímeros lineales que tienen dos extremos, cada extremo estando enlazado a un grupo funcional que puede ser el mismo o diferente.

En una realización, el derivado polimérico tiene la estructura:



en la que:

N=N=N es un resto azida;

B es un resto de unión, que puede estar presente o ausente;

POLI es un polímero soluble en agua no antigénico;

A es un resto de unión, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual que B o diferente; y

X es un segundo grupo funcional.

Los ejemplos de un resto de unión para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 18, y puede contener entre 1-10 átomos de carbono. Un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre puede incluirse con la cadena alquilo. La cadena alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de un resto de unión para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo arilo multifuncionalizado, que contiene hasta 10 y puede contener 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de unión adecuados incluyen aquellos grupos de unión descritos en las Pat. de Estados Unidos N° 5.932.462; 5.643.575; y la Publicación de Sol. de Pat. de Estados Unidos 2003/0143596. Los expertos en la técnica reconocerán que la lista anterior para restos de unión no es exhaustiva sino que es simplemente ilustrativa, y que se contempla que todos los restos de unión que tienen las cualidades que se han descrito anteriormente son adecuados para su uso en la presente invención.

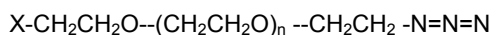
Los ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen, pero sin limitación, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo, tal como ésteres N-hidroxisuccinimidilo y ésteres 1-benzotriazolilo, carbonato activo, tal como carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, aldehído hidratos, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno, cetona y azida. Como se entenderá por los expertos en la técnica, el resto X seleccionado debe ser compatible con el grupo azida para que la reacción con el grupo azida no ocurra. Los derivados poliméricos que contienen azida pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es un resto azida, o heterobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

El término "protegido" se refiere a la presencia de un grupo protector o resto que evita la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se protege. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o un hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse entre el grupo de terc-butiloxycarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridilidisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo, tal como metilo, etilo o terc-butilo. También pueden usarse en la presente invención otros grupos protectores conocidos en la técnica.

Los ejemplos específicos de grupos funcionales terminales en la bibliografía incluyen, pero sin limitación, carbonato de N-succinimidilo (véase, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos N° 5.281.698, 5.468.478), amina (véase, por ejemplo, Buckmann y col., Makromol. Chem. 182: 1379 (1981), Zalipsky y col. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (véase, por ejemplo, Andresz y col. Makromol. Chem. 179: 301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, por ejemplo, Olson y col. en Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, págs. 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; véase también la Pat. de Estados Unidos N° 5.672.662), succinato de succinimidilo (véase, por ejemplo, Abuchowski y col. Cancer Biochem. Biophys. 7: 175 (1984) y Joppich y col. Makromol. Chem. 180: 1381 (1979), éster succinimidilo (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N° 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N° 5.650.234), éter glicidilo (véase, por ejemplo, Pitha y col. Eur. J Biochem. 94: 11 (1979), Elling y col., Biotech. Appl. Biochem. 13: 354 (1991), oxycarbonilimidazol (véase, por ejemplo, Beauchamp, y col., Anal. Biochem. 131: 25 (1983), Tondelli y col. J. Controlled Release 1: 251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (véase, por ejemplo, Veronese, y col., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); y Sartore y col., Appl. Biochem. Biotech., 27: 45 (1991)), aldehído (véase, por ejemplo, Harris y col. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22: 341 (1984), la Pat. de Estados Unidos N°

5.824.784, la Pat. de Estados Unidos N° 5.252.714), maleimida (véase, por ejemplo, Goodson y col. Biotechnology (NY) 8: 343 (1990), Romani y col. en Chemistry of Peptides and Proteins 2: 29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22: 2417 (1992)), ortopiridildisulfuro (véase, por ejemplo, Woghiren, y col. Bioconj. Chem. 4: 314 (1993)), acrilol (véase, por ejemplo, Sawhney y col., Macromolecules, 26: 581 (1993)), vinilsulfona (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N° 5.900.461).

En ciertas realizaciones de la presente invención, los derivados poliméricos de la invención comprenden una estructura polimérica que tiene la estructura:

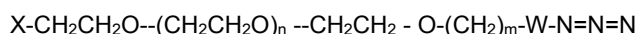


en la que:

10 X es un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; y

n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000.

En otra realización, los derivados poliméricos de la invención comprenden una estructura polimérica que tiene la estructura:



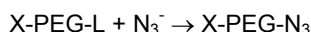
15 en la que:

W es un resto conector alifático o aromático que comprende entre 1-10 átomos de carbono;

n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y

X es un grupo funcional como se ha descrito anteriormente. m está entre 1 y 10.

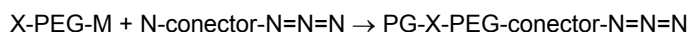
20 Los derivados de PEG que contienen azida de la invención pueden prepararse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento. En un procedimiento, que se muestra a continuación, una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, teniendo la estructura polimérica un primer extremo unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo unido a un grupo saliente adecuado, se hace reaccionar con un anión de azida (que puede estar emparejado con cualquiera de varios contraiones adecuados, incluyendo sodio, potasio, terc-butilamonio y así sucesivamente). El grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por el resto azida, proporcionando el polímero de PEG que contiene azida deseado.



30 Como se muestra, una estructura polimérica adecuada para su uso en la presente invención tiene la fórmula X-PEG-L, en la que PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo funcional que no reacciona con los grupos azida y L es un grupo saliente adecuado. Los ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, hidroxilo, hidroxilo protegido, acetal, alquenoilo, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, maleimida, ditiopiridina y vinilpiridina, y cetona. Los ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato.

35 En otro procedimiento para la preparación de los derivados poliméricos que contienen azida de la presente invención, un agente de unión que tiene una funcionalidad azida se pone en contacto con una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, en la que el agente de unión tiene una funcionalidad química que reaccionará selectivamente con una funcionalidad química en el polímero de PEG, para formar un producto del derivado polimérico que contiene azida en el que la azida se separa de la estructura polimérica por un grupo de unión.

40 A continuación se muestra un esquema de reacción ejemplar:



en la que:

45 PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo protector terminal, tal como alcoxi o un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; y M es un grupo funcional que no reacciona con la funcionalidad azida pero que reaccionará de forma eficaz y selectiva con el grupo funcional N.

Los ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, M que es un ácido carboxílico, carbonato o éster activo si N es una amina; M que es una cetona si N es un resto hidrazida o aminooxi; M que es un grupo saliente si N es un nucleófilo.

La purificación del producto en bruto puede realizarse mediante procedimientos conocidos que incluyen, pero sin

limitación, la precipitación del producto seguido de cromatografía, si es necesario.

A continuación se muestra un ejemplo más específico en el caso de PEG diamina, en el que una de las aminas está protegida por un resto del grupo protector, tal como terc-butil-Boc y la PEG diamina mono-protegida resultante reacciona con un resto de unión que tiene la funcionalidad azida:



En este caso, el grupo amina puede acoplarse al grupo de ácido carboxílico usando una diversidad de agentes de activación, tales como reactivos de cloruro de tionilo o carbodiimida y N-hidroxisuccinimida o N-hidroxibenzotriazol para crear un enlace amida entre el derivado de PEG monoamina y el resto conector que lleva la azida. Después de la formación exitosa del enlace amida, el derivado que contiene azida N-terc-butil-Boc-protegido resultante puede usarse directamente para modificar las moléculas bioactivas, o puede elaborarse adicionalmente para instalar otros grupos funcionales útiles. Por ejemplo, el grupo N-t-Boc puede hidrolizarse por tratamiento con un ácido fuerte para generar una omega-amino-PEG-azida. La amina resultante puede usarse como un mango sintético para instalar otra funcionalidad útil, tal como grupos maleimida, disulfuros activados, ésteres activados y así sucesivamente, para la creación de reactivos heterobifuncionales valiosos.

15 Los derivados heterobifuncionales son particularmente útiles cuando se desea unir diferente moléculas a cada extremo del polímero. Por ejemplo, el omega-N-amino-N-azido PEG permitirá la unión de una molécula que tiene un grupo electrófilo activado, tal como un aldehído, cetona, éster activado, carbonato activado, y así sucesivamente, a un extremo del PEG y una molécula que tiene un grupo acetileno al otro extremo del PEG.

En otra realización de la invención, el derivado polimérico tiene la estructura:



en la que:

R puede ser H o un grupo alquilo, alqueno, alcoxi o arilo o arilo sustituido;

B es un resto de unión, que puede estar presente o ausente;

POLI es un polímero soluble en agua no antigénico;

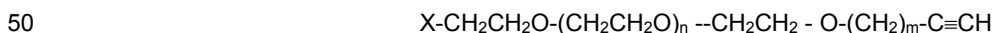
25 A es un resto de unión, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual que B o diferente; y

X es un segundo grupo funcional.

Los ejemplos de un resto de unión para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 18, y puede contener entre 1-10 átomos de carbono. Puede incluirse un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre con la cadena alquilo. La cadena alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de un resto de unión para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo arilo multifuncionalizado, que contiene hasta 10 y puede contener 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de unión adecuados incluyen los grupos de unión descritos en las Pat. de Estados Unidos N° 5.932.462 y 5.643.575 y la Publicación de Sol. de Pat. de Estados Unidos 2003/0143596. Los expertos en la técnica reconocerán que la lista anterior para los restos de unión no pretende ser exhaustiva sino simplemente ilustrativa, y se contempla que una amplia diversidad de restos de unión que tienen las cualidades que se han descrito anteriormente es útil en la presente invención.

Los ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxi, éster activo, tal como ésteres N-hidroxisuccinimidilo y ésteres 1-benzotriazolilo, carbonato activo, tal como carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, aldehído hidratos, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos y tresilato, alqueno, cetona y acetileno. Como se entenderá, el resto X seleccionado debe ser compatible con el grupo acetileno para que la reacción con el grupo acetileno no ocurra. Los derivados poliméricos que contienen acetileno pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es un resto acetileno, o heterobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

En otra realización de la presente invención, los derivados poliméricos comprenden una estructura polimérica que tiene la estructura:

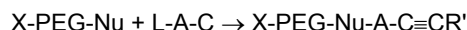


en la que:

X es un grupo funcional como se ha descrito anteriormente;
n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y
m está entre 1 y 10.

A continuación se muestran ejemplos específicos de cada uno de los polímeros de PEG heterobifuncionales.

- 5 Los derivados de PEG que contienen acetileno de la invención pueden prepararse usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y/o descritos en el presente documento. En un procedimiento, una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, teniendo la estructura polimérica un primer extremo unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo unido a un grupo nucleófilo adecuado, se hace reaccionar con un compuesto que tiene tanto una funcionalidad acetileno como un grupo saliente que es adecuado para la reacción con el grupo nucleófilo en el PEG.
- 10 Cuando el polímero de PEG que tiene el resto nucleófilo y la molécula que tiene el grupo saliente se combinan, el grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por el resto nucleófilo, proporcionando el polímero que contiene acetileno deseado.



- 15 Como se muestra, una estructura polimérica preferida para su uso en la reacción tiene la fórmula X-PEG-Nu, en la que PEG es poli(etilenglicol), Nu es un resto nucleófilo y X es un grupo funcional que no reacciona con Nu, L o la funcionalidad acetileno.

Los ejemplos de Nu incluyen, pero sin limitación, grupos amina, alcoxi, ariloxi, sulfhidrido, imino, carboxilato, hidrazida, aminoxi que reaccionarán principalmente a través de un mecanismo del tipo SN2. Los ejemplos adicionales de grupos Nu incluyen aquellos grupos funcionales que reaccionarán principalmente a través de una reacción de adición nucleófila. Los ejemplos de grupos L incluyen cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato y otros grupos que se espera que experimenten desplazamiento nucleófilo, así como cetonas, aldehídos, tioésteres, olefinas, grupos carbonilo alfa-beta insaturados, carbonatos y otros grupos electrófilos que se espera que experimenten adición por nucleófilos.

20

- 25 En otra realización de la presente invención, A es un conector alifático de entre 1-10 átomos de carbono o un anillo arilo sustituido de entre 6-14 átomos de carbono. X es un grupo funcional que no reacciona con grupos azida y L es un grupo saliente adecuado.

En otro procedimiento para la preparación de los derivados poliméricos que contienen acetileno de la invención, un polímero de PEG que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, que lleva un grupo funcional protegido o un agente protector en un extremo y un grupo saliente adecuado en otro extremo, se pone en contacto mediante un anión de acetileno.

30

A continuación, se muestra un esquema de reacción ejemplar:



en la que:

- 35 PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo protector, tal como alcoxi o un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; y R' es H, un grupo alquilo, alcoxi, arilo o ariloxi o un grupo alquilo, alcoxi, arilo o ariloxi sustituido.

En el ejemplo anterior, el grupo saliente L debe ser lo suficientemente reactivo para experimentar un desplazamiento del tipo SN2 cuando se pone en contacto con una concentración suficiente del anión de acetileno. Las condiciones de reacción requeridas para realizar el desplazamiento de SN2 de grupos salientes por aniones de acetileno se conocen por los expertos en la técnica.

40

Puede conseguirse habitualmente purificación del producto en bruto por procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, precipitación del producto seguido de cromatografía, si es necesario.

Los polímeros solubles en agua pueden unirse a los polipéptidos de FGF-21 de la invención. Los polímeros solubles en agua pueden unirse mediante un aminoácido no codificado de forma natural incorporado en el polipéptido de FGF-21 o cualquier grupo funcional o sustituyente de un aminoácido codificado de forma natural o no codificado de forma natural, o cualquier grupo funcional o sustituyente añadido a un aminoácido codificado de forma natural o no codificado de forma natural. Como alternativa, los polímeros solubles en agua se unen a un polipéptido de FGF-21 incorporando un aminoácido no codificado de forma natural mediante un aminoácido de origen natural (incluyendo pero sin limitación, cisteína, lisina o el grupo amina del resto N terminal). Los polipéptidos de FGF-21 de la invención comprenden un aminoácido no natural, uniéndose un aminoácido no codificado de forma natural con un polímero o polímeros solubles en agua (incluyendo pero sin limitación, PEG y/u oligosacáridos). En algunos casos, los polipéptidos de FGF-21 de la invención comprenden adicionalmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más aminoácidos codificados de forma natural unidos con polímeros solubles en agua. En algunos casos, los polipéptidos de FGF-21 de la invención comprenden uno o más aminoácidos no codificados de forma natural unidos a polímeros solubles en

45

50

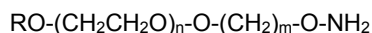
agua y uno o más aminoácidos de origen natural unidos a polímeros solubles en agua. En algunas realizaciones, los polímeros solubles en agua usados en la presente invención potencian la semivida en suero del polipéptido de FGF-21 en relación con la forma no conjugada.

5 El número de polímeros solubles en agua unidos a un polipéptido de FGF-21 (es decir, el alcance de la PEGilación o glicosilación) de la presente invención puede ajustarse para proporcionar una característica farmacológica, farmacocinética o farmacodinámica alterada (incluyendo pero sin limitación, aumentada o reducida) tal como semivida *in vivo*. En algunas realizaciones, la semivida de FGF-21 aumenta al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 por ciento, 2-veces, 5-veces, 6-veces, 7-veces, 8-veces, 9-veces, 10-veces, 11-veces, 12-veces, 13-veces, 14-veces, 15-veces, 16-veces, 17-veces, 18-veces, 19-veces, 20-veces, 25-veces, 30-veces, 35-veces, 40-veces, 50-veces, o al menos aproximadamente 100-veces sobre un polipéptido no modificado.

Derivados de PEG que contienen un grupo nucleófilo fuerte (es decir, hidracida, hidracina, hidroxilamina o semicarbacida)

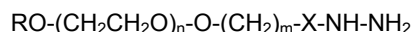
15 En una realización de la presente invención, un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto de hidracina, hidrolamina, hidracida o semicarbacida terminal que se une directamente a la cadena principal de PEG.

En algunas realizaciones, el derivado de PEG hidroxilamina-terminal tendrá la estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5-40 kDa).

20 En algunas realizaciones, el derivado de PEG que contiene hidrazina o hidrazida tendrá la estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

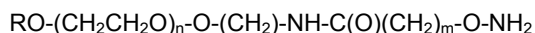
En algunas realizaciones, el derivado de PEG que contiene semicarbazida tendrá la estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000.

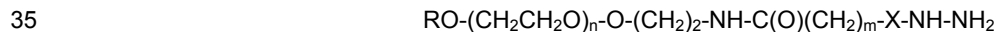
En otra realización de la invención, un polipéptido FGF-21 que comprende un aminoácido que contiene carbonilo está modificado con un derivado de PEG que contiene un resto terminal hidroxilamina, hidrazida, hidrazina o semicarbazida que está unido a la estructura de PEG por medio de un enlace amida.

30 En algunas realizaciones, los derivados de PEG hidroxilamina-terminales tienen la estructura:



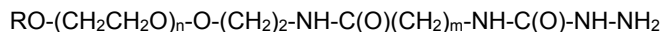
en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5-40 kDa).

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen hidrazina o hidrazida tienen la estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen semicarbazida tienen la estructura:

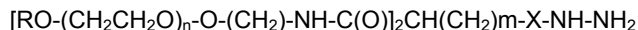


40 en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000.

En otra realización de la invención, un polipéptido FGF-21 que comprende un aminoácido que contiene carbonilo está modificado con un derivado de PEG ramificado que contiene un resto terminal hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida, con cada cadena del PEG ramificado que tiene un PM que varía de 10-40 kDa y, puede ser de 5-20 kDa.

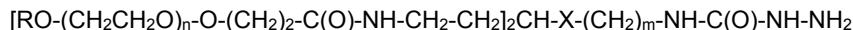
45 En otra realización de la invención, un polipéptido FGF-21 que comprende un aminoácido codificado sintéticamente está modificado con un derivado de PEG que tiene una estructura ramificada. Por ejemplo, en algunas realizaciones,

el derivado de PEG hidrazina- o hidrazida-terminal tendrá la siguiente estructura:



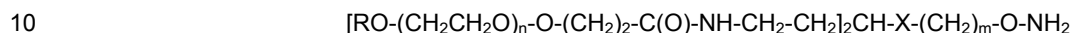
en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

5 En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen un grupo semicarbazida tendrán la estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), X es opcionalmente NH, O, S, C(O) o no está presente, m es 2-10 y n es 100-1.000.

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen un grupo hidroxilamina tendrán la estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), X es opcionalmente NH, O, S, C(O) o no está presente, m es 2-10 y n es 100-1.000.

15 El grado y sitios a los que se unen el polímero o los polímeros solubles en agua con el polipéptido de FGF-21 pueden modular la unión del polipéptido de FGF-21 con el receptor de polipéptido de FGF-21. En algunas realizaciones, los enlaces se disponen de modo que el polipéptido de FGF-21 se una al receptor de polipéptido de FGF-21 con una K_d de aproximadamente 400 nM o inferior, con una K_d de 150 nM o inferior, y en algunos casos con una K_d de 100 nM o inferior, como se mide por un ensayo de unión en equilibrio, tal como el descrito en Spencer y col., J. Biol. Chem., 263: 7862-7867 (1988) para FGF-21.

20 Se describen procedimientos y química para activación de polímeros así como para conjugación de péptidos en la bibliografía y se conocen en la técnica. Los procedimientos habitualmente usados para activación de polímeros incluyen, pero sin limitación, activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorhidrina, divinilsulfona, carbodiimida, sulfonil haluros, triclorotriacina, etc. (véase, R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILIZATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N. Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson y col., (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N. Y.; Dunn, R. L., y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D. C. 1991).

30 Están disponibles varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG. Véase, por ejemplo, Harris, Macromol. Chem. Phys. C25: 325-373 (1985); Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65 (1987); Wong y col., Enzyme Microb. Technol. 14: 866-874 (1992); Delgado y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249-304 (1992); Zalipsky, Bioconjugate Chem. 6: 150-165 (1995).

35 También pueden encontrarse procedimientos para activación de polímeros en el documento WO 94/17039, Patente de Estados Unidos N° 5.324.844, documento WO 94/18247, documento WO 94/04193, Patente de Estados Unidos N° 5.219.564, Patente de Estados Unidos N° 5.122.614, documento WO 90/13540, Patente de Estados Unidos N° 5.281.698 y documento WO 93/15189, y para conjugación entre polímeros activados y enzimas incluyendo pero sin limitación Factor de Coagulación VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), molécula transportadora de oxígeno (Patente de Estados Unidos N° 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y col., App. Biochem. Biotech. 11: 141-52 (1985)).

40 Se lleva a cabo PEGilación (es decir, adición de cualquier polímero soluble en agua) de polipéptidos de FGF-21 que contienen un aminoácido no codificado de forma natural, tal como *p*-azido-L-fenilalanina, por cualquier procedimiento conveniente. Por ejemplo, se PEGila polipéptido de FGF-21 con un derivado de mPEG terminado con alquino. Brevemente, se añade un exceso de mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH sólido, con agitación, a una solución acuosa de polipéptido de FGF-21 que contiene *p*-azido-L-Phe a temperatura ambiente. Típicamente, la solución acuosa se tampona con un tampón que tiene una pK_a cerca del pH al que se debe llevar a cabo la reacción (generalmente aproximadamente pH 4-10). Los ejemplos de tampones adecuados para PEGilación a pH 7,5, por ejemplo, incluyen, pero sin limitación, HEPES, fosfato, borato, TRIS-HCl, EPPS, y TES. El pH se controla continuamente y se ajusta si es necesario. Típicamente se permite que la reacción continúe durante aproximadamente 1-48 horas.

50 Los productos de reacción se someten posteriormente a cromatografía de interacción hidrófoba para separar las variantes de polipéptido de FGF-21 PEGiladas de mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH libre y cualquier complejo de peso molecular alto del polipéptido de FGF-21 PEGilado que pueda formarse cuando se activa PEG no bloqueado en ambos extremos de la molécula, reticulando de este modo moléculas variantes del polipéptido de FGF-21. Las condiciones durante la cromatografía de interacción hidrófoba son tales que mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH libre fluye a través de la columna, mientras que cualquier complejo de variante de polipéptido de FGF-21 PEGilado reticulado se eluye después de las formas deseadas, que contienen una molécula variante del polipéptido de FGF-21 conjugada

con uno o más grupos de PEG. Las condiciones adecuadas varían dependiendo de los tamaños relativos de los complejos reticulados frente a los conjugados deseados y se determinan fácilmente por los expertos habituales en la materia. El eluyente que contiene los conjugados deseados se concentra por ultrafiltración y se desala por diafiltración.

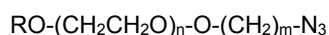
- 5 Si es necesario, el polipéptido de FGF-21 PEGilado obtenido de la cromatografía hidrófoba puede purificarse adicionalmente por uno o más procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (usando, incluyendo pero sin limitación, DEAE SEPHAROSE); cromatografía en sílice, HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, incluyendo pero sin limitación, SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de quelado metálico; ultrafiltración/diafiltración; precipitación de etanol; precipitación de sulfato de amonio; cromatocentrado; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluyendo pero sin limitación centrado isoelectrico preparatorio), solubilidad diferencial (incluyendo pero sin limitación precipitación de sulfato de amonio) o extracción. El peso molecular aparente puede estimarse por GPC por comparación con patrones de proteínas globulares (Preneta, AZ en PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). La pureza del conjugado de FGF-21-PEG puede evaluarse por degradación proteolítica (incluyendo pero sin limitación, escisión con tripsina) seguido de análisis de espectrometría de masas. Pepin-sky RB., y col., J. Pharmcol. & Exp. Ther. 297(3): 1059-66 (2001).

Un polímero soluble en agua unido con un aminoácido de un polipéptido de FGF-21 de la invención puede derivatizarse o sustituirse adicionalmente sin limitación.

20 **Derivados de PEG que contienen azida**

En otra realización de la invención, se modifica un polipéptido de FGF-21 con un derivado de PEG que contiene un resto de azida que reaccionará con un resto de alquino presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular medio que varía de 1 a 100 kDa y, en algunas realizaciones, de 10 a 40 kDa.

- 25 En algunas realizaciones, el derivado de PEG azido terminal tendrá la estructura:



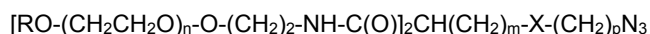
en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5-40 kDa).

En otra realización, el derivado de PEG azido terminal tendrá la estructura:

- 30 $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_p-\text{N}_3$

en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5-40 kDa).

- 35 En otra realización de la invención, un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene un resto de azida terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que varía de 1-40 kDa y puede ser de 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG azido terminal tendrá a siguiente estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), en cada caso que puede estar presente o ausente.

40 **Derivados de PEG que contienen alquino**

En otra realización de la invención, un polipéptido de FGF-21 se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto de alquino que reaccionará con un resto de azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural.

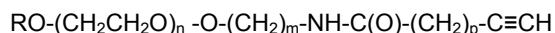
En algunas realizaciones, el derivado de PEG alquino terminal tendrá la siguiente estructura:

- 45 $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}\equiv\text{CH}$

en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5-40 kDa).

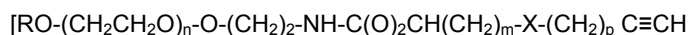
- 50 En otra realización de la invención un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto de azida terminal o alquino terminal que está unido a la cadena principal de PEG por medio de un enlace de amida.

En algunas realizaciones, el derivado de PEG alquino terminal tendrá la siguiente estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000.

- 5 En otra realización de la invención, un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido que contiene azida se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene un resto de alquino terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que varía de 10-40 kDa y puede ser de 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG alquino terminal tendrá a siguiente estructura:

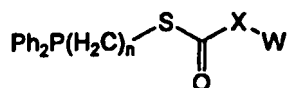


- 10 en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), o no está presente.

Derivados de PEG que contienen fosfina

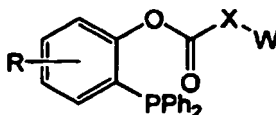
- 15 En otra realización de la invención, un polipéptido de FGF-21 se modifica con un derivado de PEG que contiene un grupo funcional activado (incluyendo pero sin limitación, éster, carbonato) que comprende adicionalmente un grupo de aril fosfina que reaccionará con un resto de azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular medio que varía de 1-100 kDa y, en algunas realizaciones, de 10-40 kDa.

En algunas realizaciones, el derivado de PEG tendrá la estructura:



en la que n es 1-10; X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, y W es un polímero soluble en agua.

- 20 En algunas realizaciones, el derivado de PEG tendrá la estructura:



- 25 en la que X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser grupos H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido. Los grupos R ejemplares incluyen, pero sin limitación, -CH₂, -C(CH₃)₃, -OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN y -NO₂. Cada uno de R', R'', R''' y R'''' se refiere independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, incluyendo, pero sin limitación, grupos arilo sustituidos con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi o tioalcoxi o arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir del análisis de sustituyente anterior, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyan átomos de carbono unidos a grupos distintos de los grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo, pero sin limitación, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (incluyendo, pero sin limitación, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

Otros derivados de PEG y técnicas de PEGilación generales

- Otras moléculas de PEG ejemplares que pueden unirse a polipéptidos de FGF-21, así como procedimientos de PEGilación incluyen, pero sin limitación, los descritos en, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/0086939; 2002/0082345; 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171; 2001/0044526; 2001/0021763; Patente de Estados Unidos N° 6.646.110; 5.824.778; 5.476.653; 5.219.564; 5.629.384; 5.736.625; 4.902.502; 5.281.698; 5.122.614; 5.473.034; 5.516.673; 5.382.657; 6.552.167; 6.610.281; 6.515.100; 6.461.603; 6.436.386; 6.214.966; 5.990.237; 5.900.461; 5.739.208; 5.672.662; 5.446.090; 5.808.096; 5.612.460; 5.324.844; 5.252.714; 6.420.339; 6.201.072; 6.451.346; 6.306.821; 5.559.213; 5.747.646; 5.834.594; 5.849.860; 5.980.948; 6.004.573; 6.129.912; documentos WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924,

5 WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO98/41562, WO98/48837, WO99/32134, WO99/32139, WO99/32140, WO96/40791, WO98/32466, WO95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 154 316. Cualquiera de las moléculas de PEG descritas en le presente documento puede usarse en cualquier forma, incluyendo pero sin limitación, cadena sencilla, cadena ramificada, cadena de múltiples ramas, funcional sencilla, bifuncional, multifuncional o cualquier combinación de las mismas.

10 Se describen derivados de PEG y polímeros adicionales en las siguientes solicitudes de patente: Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0194256, Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0217532, Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0217289, Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/755.338; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/755.711; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/755.018; Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US06/49397; documento WO 2006/069246; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/743.041; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/743.040; Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US06/47822; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/882.819; Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/882.500; y Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/870.594.

15 **Potenciación de la afinidad para albúmina de suero**

También pueden fusionarse diversas moléculas con los polipéptidos de FGF-21 de la invención para modular la semivida de los polipéptidos de FGF-21 en suero. En algunas realizaciones, las moléculas se unen o fusionan con polipéptidos de FGF-21 de la invención para potenciar la afinidad con albúmina de suero endógena en un animal.

20 Por ejemplo, en algunos casos, se realiza una fusión recombinante de un polipéptido de FGF-21 y una secuencia de unión a albúmina. Las secuencias de unión a albúmina ejemplares incluyen, pero sin limitación, el dominio de unión a albúmina de la proteína G estreptocócica (véase por ejemplo, Makrides y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 277: 534-542 (1996) y Sjolander y col., J. Immunol. Methods 201: 115-123 (1997)), o péptidos de unión a albúmina tales como los descritos en, por ejemplo, Dennis, y col., J. Biol. Chem. 277: 35035-35043 (2002).

25 En otras realizaciones, los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención se acilan con ácidos grasos. En algunos casos, los ácidos grasos promueven la unión con albúmina de suero. Véase, por ejemplo, Kurtzhals, y col., Biochem. J. 312: 725-731 (1995).

30 En otras realizaciones, los polipéptidos de FGF-21 de la invención se fusionan directamente con albúmina de suero (incluyendo pero sin limitación, albúmina de suero humano). Los expertos en la materia reconocerán que también puede unirse una amplia diversidad de otras moléculas con FGF-21 en la presente invención para modular la unión a albúmina de suero u otros componentes del suero.

X. Glicosilación de polipéptidos de FGF-21

35 La invención incluye polipéptidos de FGF-21 que incorporan uno o más aminoácidos no codificados de forma natural que portan restos de sacáridos. Los restos de sacáridos pueden ser naturales (incluyendo pero sin limitación, N-acetilglucosamina) o no naturales (incluyendo pero sin limitación, 3-fluorogalactosa). Los sacáridos también pueden unirse a los aminoácidos no codificados de forma natural por un enlace glucosídico ligado a N u O (incluyendo pero sin limitación, N-acetilgalactosa-L-serina) o un enlace no natural (incluyendo pero sin limitación, una oxima o el glucósido correspondiente unido a C o S).

40 Los restos de sacárido (incluyendo pero sin limitación, glicosilo) pueden añadirse a polipéptidos de FGF-21 *in vivo* o *in vitro*. En algunas de las realizaciones de la invención, un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene carbonilo se modifica con un sacárido derivatizado con un grupo aminooxi para generar el polipéptido glicosilado correspondiente mediante un enlace de oxima. Una vez unido al aminoácido no codificado de forma natural, el sacárido puede elaborarse adicionalmente por tratamiento con glicosiltransferasas y otras enzimas para generar un oligosacáridos unido al polipéptido de FGF-21. Véase, por ejemplo, H. Liu, y col. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003).

45 En algunas realizaciones de la invención, un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene carbonilo se modifica directamente con un glicano con estructura definida preparado como un derivado de aminooxi. Un experto habitual en la materia reconocerá que pueden usarse otras funcionalidades, incluyendo azida, alquino, hidracida, hidracina y semicarbacida para unir el sacárido con el aminoácido no codificado de forma natural.

50 En algunas realizaciones de la invención, un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene azida o alquinilo puede modificarse después por, incluyendo pero sin limitación, una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] con, incluyendo pero sin limitación, derivados de alquinilo o azida, respectivamente. Este procedimiento permite que las proteínas se modifiquen con selectividad extremadamente alta.

XI. Dímeros y multímeros de FGF-21

La presente invención también proporciona combinaciones de FGF-21 y análogos de FGF-21 tales como homodímeros, heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros (es decir, trímeros, tetrámeros, etc.) en las que FGF-21 que contiene uno o más aminoácidos no codificados de forma natural se une a otro FGF-21 o variante de FGF-21 del mismo o cualquier otro polipéptido que no sea FGF-21 o variante de FGF-21 del mismo, directamente a la cadena principal polipeptídica o mediante un engarce. Debido a su peso molecular aumentado en comparación con los monómeros, los conjugados de dímero o multímero de FGF-21 pueden mostrar propiedades nuevas o deseables, incluyendo pero sin limitación diferente semivida terapéutica farmacológica, farmacocinética, farmacodinámica, modulada o semivida en plasma modulada en relación con el FGF-21 monomérico. En algunas realizaciones, los dímeros de FGF-21 de la invención modularán la transducción de señales del receptor de FGF-21. En otras realizaciones, los dímeros o multímeros de FGF-21 de la presente invención actuarán como un antagonista, agonista o modulador del receptor de FGF-21.

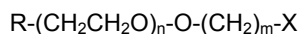
En algunas realizaciones, una o más de las moléculas de FGF-21 presentes en un dímero o multímero que contiene FGF-21 comprenden un aminoácido no codificado de forma natural unido a un polímero soluble en agua.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de FGF-21 se unen directamente, incluyendo pero sin limitación, mediante un enlace de amida Asn-Lys o enlace disulfuro Cys-Cys. En algunas realizaciones, los polipéptidos de FGF-21, y/o la molécula unida no FGF-21, comprenderán diferentes aminoácidos no codificados de forma natural para facilitar la dimerización, incluyendo pero sin limitación, un alquino en un aminoácido no codificado de forma natural de un primer polipéptido de FGF-21 y una azida en un segundo aminoácido no codificado de forma natural de una segunda molécula se conjugará mediante una cicloadición de Huisgen [3+2]. Como alternativa, FGF-21 y/o la molécula unida no FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene cetona puede conjugarse con un segundo polipéptido que comprenda un aminoácido no codificado de forma natural que contiene hidroxilamina y se hace reaccionar a los polipéptidos mediante formación de la oxima correspondiente.

Como alternativa, los dos polipéptidos de FGF-21 y/o la molécula unida no FGF-21, se unen mediante un engarce. Puede usarse cualquier engarce hetero u homobifuncional para unir las dos moléculas, y/o las moléculas unidas no FGF-21, que pueden tener la misma o diferentes secuencias primarias. En algunos casos, el engarce usado para ligar el FGF-21 y/o las moléculas unidas no FGF-21 entre sí puede ser un reactivo de PEG bifuncional. El engarce puede tener un amplio intervalo de peso molecular o longitud molecular. Pueden usarse engarces de peso molecular mayor o menor para proporcionar una relación o conformación espacial deseada entre FGF-21 y la entidad unida o entre FGF-21 y su receptor, o entre la entidad unida y su compañero de unión, si lo hubiera. También pueden usarse engarces que tengan longitud molecular más larga o más corta para proporcionar un espacio o flexibilidad deseados entre FGF-21 y la entidad unida, o entre la entidad unida y su compañero de unión, si lo hubiera.

En algunas realizaciones, la invención proporciona engarces bifuncionales solubles en agua que tienen una estructura en forma de palanqueta que incluye: a) un resto que contiene azida, alquino, hidracina, hidracida, hidroxilamina o carbonilo en al menos un primer extremo de una cadena principal polimérica; y b) al menos un segundo grupo funcional en un segundo extremo de la cadena principal polimérica. El segundo grupo funcional puede ser el mismo o diferente del primer grupo funcional. El segundo grupo funcional, en algunas realizaciones, no es reactivo con el primer grupo funcional. La invención proporciona, en algunas realizaciones, compuestos solubles en agua que comprenden al menos una rama de una estructura molecular ramificada. Por ejemplo, la estructura molecular ramificada puede ser dendrítica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona multímeros que comprenden uno o más polipéptidos de FGF-21, formados por reacciones con polímeros activados solubles en agua que tienen la estructura:



en la que n es de aproximadamente 5 a 3.000, m es 2-10, X puede ser un grupo azida, alquino, hidracina, hidracida, aminooxi, un resto que contiene hidroxilamina, acetilo o carbonilo y R es un grupo protector, un grupo funcional o un grupo saliente que puede ser el mismo o diferente que X. R puede ser, por ejemplo, un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, N-hidroxisuccinimidil éster, 1-benzotriazolil éster, N-hidroxisuccinimidil carbonato, 1-benzotriazolil carbonato, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidracida, hidracida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, y tresilato, alqueno y cetona.

XII. Medición de la actividad del polipéptido de FGF-21 y afinidad del polipéptido de FGF-21 con el receptor de polipéptido de FGF-21

Se ha mostrado que FGF-21 estimula la captación de glucosa y potencia la sensibilidad a insulina en adipocitos 3T3-L1, un modelo *in vitro* utilizado para el estudio de metabolismo del tejido adiposo como se muestra en el Ejemplo 3 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040259780. Una característica de la diabetes de Tipo 2 es la deficiencia de captación de glucosa en diversos tipos tisulares incluyendo tejido adiposo. Por lo tanto, FGF-21 es útil

para tratar diabetes de Tipo 2 reduciendo los niveles de glucosa en sangre. Además, FGF-21 es útil para tratar obesidad aumentando el gasto de energía por utilización de la glucosa más rápida y más eficaz. Adicionalmente, se ha mostrado que FGF-21 estimula la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 de una manera independiente de insulina, lo que indica que es útil también para tratar diabetes de Tipo 1. Véase Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040259780. Se ha mostrado que FGF-21 estimula la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 de una manera dependiente de concentración a una concentración subóptima de insulina (5 nM) y en ausencia de insulina en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040259780. Adicionalmente, FGF-21 induce captación de glucosa en un modelo tisular *ex vivo*, descrito en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040259780.

La captación de glucosa en adipocitos 3T3-1 puede evaluarse usando el siguiente procedimiento. Se obtienen células 3T3-L1 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, Md.). Las células se cultivan en medio de crecimiento (GM) que contiene suero bovino fetal enriquecido con hierro al 10% en medio de Eagle modificado por Dulbecco. Para diferenciación de linfocitos convencional, 2 días después de que las células alcanzaran la confluencia (denominado día 0), las células se exponen a medio de diferenciación (DM) que contiene suero bovino fetal al 10%, insulina 10 µg/ml, dexametasona 1 µM e isobutilmetilxantina 0,5 µM, durante 48 horas. Las células se mantienen después en medio postdiferenciación que contiene suero bovino fetal al 10% e insulina 10 µg/ml. La potencia *in vitro* puede medirse con el ensayo de captación de glucosa que se conoce por los expertos habituales en la materia. La potencia *in vitro* puede definirse como la medida de captación de glucosa de un compuesto de FGF-21 en un ensayo basado en células y es una medida de la potencia biológica del compuesto FGF. Puede expresarse como la CE₅₀ que es la concentración eficaz del compuesto que da como resultado 50% de actividad en un experimento de respuesta a dosis sencillo.

Ensayo de Transporte de Glucosa-Dependiente de Insulina. La captación de Hexosa, como se ensayó por la acumulación de 2-desoxi-D-[¹⁴C]glucosa 0,1 mM, se mide como sigue: se lavan adipocitos 3T3-L1 en placas de 12 pocillos dos veces con tampón KRP (NaCl 136 mM, KCl 4,7 mM, NaPO₄ 10 mM, CaCl₂ 0,9 mM, MgSO₄ 0,9 mM, pH 7,4) calentado a 37 °C y que contiene BSA 0,2%, se incuban en medio L-15 de Leibovitz que contiene BSA 0,2% durante 2 horas a 37 °C en aire ambiente, se lavan dos veces de nuevo con tampón KRP que contiene BSA 0,2%, y se incuban en tampón KRP, BSA 0,2% en ausencia (solamente Me₂SO) o presencia de wortmanina durante 30 minutos a 37 °C en aire ambiente. Se añade después insulina a una concentración final de 100 nM durante 15 minutos, y se mide la captación de 2-desoxi-D-[¹⁴C]glucosa durante los últimos 4 minutos. Se resta la captación no específica, medida en presencia de citocalasina B 10 µM, de todos los valores. Las concentraciones de proteínas se determinan con el ensayo de ácido bicinónico de Pierce. La captación se mide de forma rutinaria por triplicado o cuadruplicado para cada experimento. Puede investigarse el efecto del pretratamiento agudo y crónico de adipocitos 3T3-L1 con FGF-21 en presencia de insulina.

Ensayo de Transporte de Glucosa-Independiente de Insulina. Se siembran fibroblastos 3T3-L1 en placas de 96 pocillos y se diferencian a células grasas (adipocitos) durante 2 semanas. Después de la diferenciación se privan de alimento en medio sin suero y se tratan con FGF-21 durante 24 horas. Tras el tratamiento, las células se lavan dos veces con tampón KRBH, que contiene BSA al 0,1%. Se realiza captación de glucosa en presencia de glucosa marcada (sin insulina) en tampón KPBH. Se ha mostrado que FGF-21 estimula la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 de una manera dependiente de concentración a una concentración subóptima de insulina (5 nM) y en ausencia de insulina (véase Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004259780). Adicionalmente, puede mostrarse que los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención inducen captación de glucosa en un modelo tisular *ex vivo*.

En el modelo de transporte de glucosa *ex vivo*, el ensayo de transporte de glucosa se describe como sigue: Soluciones Madre de Tampón de Krebs-Henseleit: Solución Madre 1: NaCl (1,16 M); KCl (0,046 M); KH₂PO₄ (0,0116 M); NaHCO₃ (0,0253 M), Solución Madre 2: CaCl₂ (0,025 M); MgSO₄ (2H₂O) (0,0116 M). BSA: Usar Fracción V de Cohn de ICN, BSA sin ácidos grasos directamente sin dializar. Preparación de Medio: Añadir 50 ml de solución madre de Krebs de 1 a 395 ml de dH₂O y gas con O₂ 95%/CO₂ 5% durante 1 hora. Añadir 50 ml de solución madre 2 y llevar a 500 ml con dH₂O. Añadir 500 mg de BSA sin ácido graso ICN. Medios de preincubación e incubación: Manitol 32 mM, Glucosa 8 mM. Medio de lavado: Manitol 40 mM, Piruvato 2 mM. Medio de Transporte: Manitol 39 mM, 2-DG 1 mM; Manitol 32 mM, 3-O-MG 8 mM. Solución de Insulina: (Insulina Porcina [Lilly] 100.000.000 de µU/ml) a una concentración final de 2000 µU/ml o 13,3 nM. Preparación de Medio de Marcaje Radiactivo: Actividades específicas usadas: 2DG=1,5 mCi/ml; 3-O-G=437 µCi/ml; o Manitol=8 µCi/m. Se anestesió a las ratas con 0,1 cm³ de Nembutal por 100 g de peso corporal. Se escinde tejido muscular y se aclara en solución salina 0,9%, después se sitúa en medio de preincubación (2 ml) a 29 °C durante 1 hora. El tejido muscular se transfiere a medio de incubación (2 ml; igual que la preincubación excepto que incluye insulina o compuesto de ensayo) y se incuban durante 30 minutos (depende de las condiciones experimentales). El tejido muscular se transfiere después a medio de lavado (2 ml) durante 10 minutos a 29 °C, después se transfiere a medio de marcaje (1,5 ml) durante 10 minutos (3-O-MG) o 20 minutos (2DG). El tejido muscular se reduce, se pesa y se sitúa en tubos de polipropileno en hielo seco. Se añade 1 ml de KOH 1 N a los tubos que se sitúan después en un baño de agua a 70 °C durante 10-15 minutos, agitando los tubos en vórtex cada pocos minutos. Los tubos se enfrían en hielo y se añade 1 ml de HCl 1 N, después se mezcla bien. Se ponen después 200 µl de sobrenadante en viales de centelleo duplicados y se cuentan en un contador de centelleo en comparación con patrones radiactivos conocidos.

Para contracción, los músculos se incuban primero durante 1 hora en medio de preincubación/incubación. Después de 1 hora, se sujeta un músculo de cada par (un par por rata) en el aparato de estimulación y el otro músculo se transfiere a un nuevo matraz de medio de incubación. El músculo contraído se estimula por series de 200 milisegundos de 70 Hz siendo cada impulso en una serie de 0,1 milisegundos. Las series se suministran a 1/segundo a 10-15 V durante 2 x 10 minutos con un descanso de 1 minuto entre medias. Al final del periodo de estimulación, el músculo se retira del aparato de estimulación y se sitúa en medio de lavado durante 10 minutos, seguido de medio de marcaje como se ha perfilado anteriormente.

El receptor de FGF puede prepararse usando técnicas y procedimientos que se conocen por un experto habitual en la materia. La actividad del polipéptido de FGF-21 puede determinarse usando ensayos *in vitro* o *in vivo* convencionales o conocidos. Para un polipéptido de FGF-21 PEGilado o no PEGilado que comprende un aminoácido no natural, puede medirse la afinidad de FGF-21 con su receptor usando un biosensor BIAcore™ (Pharmacia).

Independientemente de qué procedimientos se usen para crear los polipéptidos de FGF-21, los polipéptidos de FGF-21 se someten a ensayos con respecto a actividad biológica. En general, el ensayo con respecto a actividad biológica debería proporcionar análisis para el resultado deseado, tal como aumento o reducción de la actividad biológica (en comparación con FGF-21 modificado), diferente actividad biológica (en comparación con FGF-21 modificado), análisis de afinidad del compañero de unión o receptor, cambios conformacionales o estructurales del FGF-21 en sí mismo o su receptor (en comparación con el FGF-21 modificado), o análisis de semivida en suero.

La compilación anterior de referencias para metodologías de ensayo no es exhaustiva, y los expertos habituales en la materia reconocerán otros ensayos útiles para ensayar con respecto al resultado final deseado.

XIII. Medición de potencia, semivida *in vivo* funcional y parámetros farmacocinéticos

Un aspecto importante de la invención es la semivida biológica prolongada que se obtiene por construcción del polipéptido de FGF-21 con conjugación del polipéptido con un resto de polímero soluble en agua. La rápida reducción después de la administración de las concentraciones en suero del polipéptido de FGF-21 ha hecho importante evaluar las respuestas biológicas al tratamiento con polipéptido de FGF-21 conjugado y no conjugado y variantes del mismo. El polipéptido de FGF-21 conjugado y no conjugado y variantes del mismo de la presente invención pueden tener semividas en suero prolongadas también después de la administración mediante, por ejemplo, administración subcutánea o i.v., haciendo posible medir por, por ejemplo, procedimiento de ELISA o por un ensayo de exploración primaria. Pueden usarse kits de ELISA o RIA de fuentes comerciales. La medición de semivida biológica *in vivo* se lleva a cabo como se describe en el presente documento.

La potencia y semivida *in vivo* funcional de un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural puede determinarse de acuerdo con protocolos conocidos por los expertos habituales en la materia.

Los parámetros farmacocinéticos para un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural pueden evaluarse en ratas macho Sprague-Dawley normales (N=5 animales por grupo de tratamiento). Los animales recibirán una dosis sencilla de 25 µg/rata iv o 50 µg/rata sc, y se tomarán aproximadamente 5-7 muestras sanguíneas de acuerdo con un ciclo temporal predefinido, que abarcan generalmente aproximadamente 6 horas para un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural no conjugado con un polímero soluble en agua y aproximadamente 4 días para un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural y conjugado con un polímero soluble en agua. Los datos farmacocinéticos para FGF-21 sin un aminoácido no codificado de forma natural pueden compararse directamente con los datos obtenidos para polipéptidos de FGF-21 que comprenden un aminoácido no codificado de forma natural.

Los parámetros farmacocinéticos también pueden evaluarse en un primate, por ejemplo, monos cynomolgus. Típicamente, se administra una inyección sencilla por vía subcutánea o por vía intravenosa, y se controlan los niveles de FGF-21 en suero a lo largo del tiempo.

La actividad específica de polipéptidos de FGF-21 de acuerdo con la presente invención puede determinarse por diversos ensayos conocidos en la técnica. La actividad biológica de las muteínas del polipéptido de FGF-21, o fragmentos de las mismas, obtenidas y purificadas de acuerdo con la presente invención puede ensayarse por procedimientos descritos o a los que se ha hecho referencia en el presente documento o conocidos por los expertos habituales en la materia.

Pueden usarse polipéptidos de la presente invención para tratar a mamíferos que padecen Diabetes Mellitus no insulino dependiente (NIDDM: Tipo 2), diabetes insulino dependiente (Tipo 1), así como obesidad, eliminación de glucosa inadecuada, hiperglucemia, hiperinsulinemia y similares. FGF-21 es eficaz en modelos animales de diabetes y obesidad, como se muestra en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 20040259780. Puesto que los perfiles metabólicos difieren entre diversos modelos animales de obesidad y diabetes, se ha emprendido el análisis de múltiples modelos para separar los efectos de hiperinsulinemia, hiperglucemia y obesidad. Los ratones con diabetes (db/db) y obesos (ob/ob) se caracterizan por obesidad masiva, hiperfagia, hiperglucemia variable, resistencia a insulina, hiperinsulinemia y termogénesis alterada (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafir, en

Diabetes Mellitus; H. Rifkin y D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., Nueva York, ed. 4, 1990), pp. 299-340). Sin embargo, la diabetes es mucho más grave en el modelo db/db (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafir, en Diabetes Mellitus; H. Rifkin y D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., Nueva York, ed. 4, 1990), pp. 299-340). Las ratas Zucker (fa/fa) son gravemente obesas, hiperinsulinémicas y resistentes a insulina (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafir, en Diabetes Mellitus; H. Rifkin y D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., Nueva York, ed. 4, 1990), pp. 299-340), y la mutación fa/fa puede ser el equivalente en ratas de la mutación db murina (Friedman y col., Cell 69: 217-220, 1992; Truett y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7806, 1991). Las ratas Tubby (tub/tub) se caracterizan por obesidad, resistencia moderada a insulina e hiperinsulinemia sin hiperglucemia significativa (Coleman y col., J. Heredity 81: 424, 1990).

10 También puede examinarse el modelo de glutamato monosódico (MSG) para obesidad inducida químicamente (Olney, Science 164: 719, 1969; Cameron y col., Cli. Exp. Pharmacol. Physiol. 5: 41, 1978), en el que la obesidad es menos grave que en los modelos genéticos y se desarrolla sin hiperfagia, hiperinsulinemia ni resistencia a insulina. Finalmente, puede ensayarse el modelo de estreptozotocina (STZ) para diabetes inducida químicamente para examinar los efectos de hiperglucemia en ausencia de obesidad. Los animales tratados con STZ son deficientes en insulina y gravemente hiperglucémicos (Coleman, Diabetes 31: 1, 1982; E. Shafir, en Diabetes Mellitus; H. Rifkin y D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., Nueva York, ed. 4, 1990), pp. 299-340).

Los polipéptidos de FGF-21 de la invención pueden evaluarse en un modelo de choque séptico *in vivo* en ratones ob/ob. Véase Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20050176631.

XIV. Administración y composiciones farmacéuticas

20 Los polipéptidos o proteínas de la invención (incluyendo pero sin limitación, FGF-21, sintetizadas, proteínas que comprenden uno o más aminoácidos no naturales, etc.) se emplean opcionalmente para usos terapéuticos, incluyendo pero sin limitación, en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado. Tales composiciones, por ejemplo, comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un vehículo o excipiente tal incluye, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y/o combinaciones de los mismos. La formulación se realiza para adecuarse al modo de administración. En general, se conocen procedimientos para administrar proteínas por los expertos habituales en la materia y pueden aplicarse a administración de los polipéptidos de la invención.

Se ensayan opcionalmente composiciones terapéuticas que comprenden uno o más polipéptidos de la invención en uno o más modelos animales *in vitro* y/o *in vivo* apropiados de enfermedad, para conformar la eficacia, metabolismo tisular y para estimar las dosificaciones, de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia. En particular, las dosificaciones pueden determinarse inicialmente por medidas de actividad, estabilidad u otras adecuadas de homólogos de aminoácidos no naturales del presente documento con respecto a naturales (incluyendo pero sin limitación, comparación de un polipéptido de FGF-21 modificado para incluir uno o más aminoácidos no naturales con un polipéptido de FGF-21 con aminoácidos naturales), es decir, en un ensayo relevante.

La administración es por cualquiera de las vías normalmente usadas para introducir una molécula en contacto final con células sanguíneas o tisulares. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales de la invención se administran de cualquier manera adecuada, opcionalmente con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Están disponibles procedimientos adecuados para administrar tales polipéptidos en el contexto de la presente invención y, aunque puede usarse más de una vía para administrar una composición particular, una vía particular puede proporcionar con frecuencia una acción o reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.

Se determinan vehículos farmacéuticamente aceptables en parte por la composición particular que se administra, así como por el procedimiento particular usado para administrar la composición. En consecuencia, hay una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención.

45 Pueden administrarse polipéptidos de FGF-21 de la invención por cualquier vía convencional adecuada para proteínas o péptidos, incluyendo, pero sin limitación, por vía parenteral, por ejemplo inyecciones incluyendo, pero sin limitación, por vía subcutánea o vía intravenosa o cualquier otra forma de inyecciones o infusiones. Pueden administrarse composiciones de polipéptidos por varias vías incluyendo, pero sin limitación, medio oral, intravenoso, intraperitoneal, intramuscular, transdérmico, subcutáneo, tópico, sublingual, o rectal. Las composiciones que comprenden polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, también pueden administrarse mediante liposomas. Tales vías de administración y formulaciones apropiadas se conocen en general por los expertos en la materia. El polipéptido de FGF-21 puede usarse solo o en combinación con otros componentes adecuados tales como un vehículo farmacéutico. El polipéptido de FGF-21 puede usarse en combinación con otros agentes, incluyendo pero sin limitación, un agente antidiabético oral.

55 La expresión "agente antidiabético" significará cualquier fármaco que sea útil en el tratamiento, prevención o reducción de otro modo de la gravedad de cualquier trastorno del metabolismo de la glucosa, o cualquier complicación del mismo, incluyendo cualquiera de las afecciones, enfermedad o complicaciones descritas en el presente documento. Los agentes antidiabéticos incluyen insulina, tiazolidinedionas, sulfonilureas, derivados de

ácido benzoico, inhibidores de alfa-glucosidasa o similares. Otras categorías generales de agentes antidiabéticos que pueden ser parte de una composición objeto incluyen (estando los términos definidos entre comillas): “artículos farmacológicos” reconocidos en la Farmacopea de Estados Unidos oficial o Formulario Nacional oficial (o cualquier suplemento de los mismos): “nuevo fármaco” y “nuevo fármaco animal” aprobado por la FDA de los Estados Unidos como se usan esas expresiones en el Título 21 del Código de los Estados Unidos; cualquier fármaco que requiera la aprobación de una entidad gubernamental, en los Estados Unidos o en el extranjero (“fármaco aprobado”); cualquier fármaco para el que sea necesario obtener la aprobación reguladora para cumplir con 21 U.S.C. .sctn.355(a) (“fármaco aprobado por el regulador”); cualquier agente que se someta o se haya sometido a una aplicación farmacológica humana según 21 U.S.C. sctn.379(g) (“fármaco humano”). (Todas las referencias a código estatutario para la presente definición se refieren a dicho código según la fecha de presentación original de la presente solicitud). Se desvelan otros agentes antidiabéticos en el presente documento, y se conocen por los expertos en la materia. Los fármacos o agentes antidiabéticos actuales usados para tratar diabetes de Tipo 2 que se conocen bien en la técnica incluyen varias categorías: las biguanidas, tiazolidinedionas, las sulfonilureas, derivados de ácido benzoico e inhibidores de glucosidasa. Estos fármacos habitualmente tienen distintos modos de acción. Se cree que las biguanidas, por ejemplo, metformina, evitan la gluconeogénesis hepática excesiva. Se cree que las tiazolidinedionas actúan aumentando la tasa de evacuación de glucosa periférica. Las sulfonilureas, por ejemplo, tolbutamida y gliburida, y los derivados de ácido benzoico, por ejemplo, repaglinida, reducen la glucosa en plasma estimulando la secreción de insulina. Los inhibidores de alfa-glucosidasa inhiben de forma competitiva alfa-glucosidasa, que metaboliza carbohidratos, retardando de este modo la absorción de carbohidratos y atenuando la hiperglucemia postprandial. Además, se han propuesto varias terapias para tratamiento y diabetes que aún no se han aprobado para su uso humano.

Los fármacos actuales o agentes antidiabéticos usados para tratar la diabetes y sus síndromes precursores, tales como resistencia a insulina, que se conocen bien en la técnica incluyen cinco clases de compuestos: las biguanidas, por ejemplo, metformina; tiazolidinedionas; las sulfonilureas, por ejemplo, tolbutamida y gliburida; derivados de ácido benzoico, por ejemplo repaglinida; e inhibidores de glucosidasa. Además de estos agentes, pueden usarse varias otras terapias en combinación con los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención para mejorar el control de glucosa, incluyendo pero sin limitación inhibidores de DPP-4. Ciertos de estos agentes antidiabéticos se han aprobado para su uso humano. Los compuestos de DPP-4 candidatos ensayados en ensayos clínicos incluyen Vildagliptina (Galvus) (LAF237), Sitagliptina (Januvia), Saxagliptina y Alogliptina. Januvia (Sitagliptina) se aprobó para el tratamiento de diabetes de tipo 2 en los Estados Unidos el 17 de octubre de 2006, para su uso como monoterapia, o terapia de combinación, con metformina o una tiazolidinediona. La administración del compuesto de Novartis de primera generación 1-[[[2-[(5-ciano-piridin-2-il)amino]etil]amino]acetil]-2-ciano-(S)-pirrolidina (NVP DPP728) durante un periodo de 4 semanas a 93 pacientes con diabetes de Tipo 2 (media de HbA1c de 7,4%) redujo los niveles de glucosa en plasma, insulina y HbA1c durante el periodo de estudio de 4 semanas. Véase Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV Improves Metabolic Control Over α 4-Week Study Period in Type 2 Diabetes. Diabetes Care. Mayo de 2002; 25(S): 869-875. También se ha observado que los pacientes que reciben metformina muestran beneficios de reducción de glucosa aditiva después de la institución de terapia de GLP-1. Véase Additive glucose-lowering effects of glucagon-like peptide-1 and metformin in type 2 diabetes. Diabetes Care. Abril 2001; 24(4): 720-5. En un estudio de 10 pacientes varones no diabéticos obesos, se asoció la administración de metformina con niveles aumentados de GLP-1 en circulación después de carga de glucosa oral, y en experimentos usando plasma humano agrupado, y la metformina (0,1-0,5 microgramos/ml) inhibió significativamente la degradación de GLP-1(7-36)amida después de una incubación de 30 minutos a 37 grados C, en presencia o ausencia de DPP-4. Los autores de este estudio plantearon la posibilidad de que la metformina pueda inhibir la rotura enzimática de GLP-1 tanto *in vitro* como *in vivo*. Véase Effect of metformin on glucagon-like peptide I (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. Diabetes Care. Mar 2001; 24(3): 489-94. Análisis de la relación entre DPP-4 y degradación de GLP-1 usando análisis bioquímicos *in vitro*. Demuth y colaboradores no descubrieron efecto de la metformina en la degradación mediada por DPP-4 de GLP-1 usando una diversidad de fuentes de DPP-4 humano. Véase Metformin Effects on Dipeptidylpeptidase IV Degradation of Glucagon-like Peptide-1. Biochem Biophys Res Commun. Mar 2002 15;291(5):1302-8.

Entre las biguanidas útiles como agentes terapéuticos diabéticos, la metformina ha demostrado ser particularmente exitosa. La metformina (diamida N,N-dimetilimidodicarbonimidica; 1,1-dimetilbiguanida; N,N-dimetilbiguanida; N,N-dimetildiguanida; N'-dimetilguanilguanidina) es una agente antidiabético que actúa reduciendo la producción de glucosa por el hígado y disminuyendo la absorción intestinal de glucosa. También se cree que mejora la sensibilidad a insulina de los tejidos en otras partes del cuerpo (aumenta la captación y utilización de glucosa periférica). La metformina mejora la tolerancia a glucosa en sujetos con tolerancia a glucosa alterada (IGT) y sujetos diabéticos de Tipo 2, reduciendo la glucosa en plasma tanto pre como postprandial. La metformina generalmente no es eficaz en ausencia de insulina. Bailey, Diabetes Care 15: 755-72 (1992).

La eficacia de la metformina se ha mostrado en varios ensayos. En un estudio de diabéticos de Tipo 2 moderadamente obesos, los niveles de HbA1c mejoraron del 8,6 al 7,1% después de 29 semanas de terapia con metformina solamente o en combinación con sulfonilurea. DeFronzo y col., New Engl. J. Med. 333: 541-49 (1995). La metformina también tuvo un efecto favorable en los lípidos en suero, reduciendo la media de triglicéridos en suero en ayunas, el colesterol total y los niveles de colesterol de LDL y no mostrando efectos adversos en otros niveles de lípidos. En otro ensayo, la metformina mejoró el control glucémico en sujetos con NIDDM de una manera

relacionada con la dosis. Después de 14 semanas, 500 y 2000 mg de metformina diarios redujeron HbA1c en 0,9% y 2,0%, respectivamente. Garber y col., *Am J. Med.* 102: 491-97 (1997). La metformina también puede tener un efecto terapéutico beneficioso en no diabéticos resistentes a insulina. Un estudio indicó que el tratamiento de mujeres no diabéticas obesas hipertensas con metformina redujo la presión sanguínea, fibrinógeno de insulina en plasma estimulado por glucosa y en ayunas. Giugliano y col., *Diabetes Care* 16: 1387-90 (1993).

La metformina se administra habitualmente como metformina HCl. Esta, así como otras formas útiles de metformina, se contempla para su uso con polipéptidos de FGF-21 de la presente invención. En general, un régimen de dosificación fija se individualiza para el tratamiento de hiperglucemia en diabetes con metformina HCl o cualquier otro agente farmacológico. La individualización de la dosificación se realiza basándose tanto en la eficacia como en la tolerancia, sin exceder generalmente la dosis diaria recomendada máxima de 2550 mg.

Las tiazolidinedionas contempladas para su uso en la práctica de la presente invención incluyen troglitazona, y similares. Tales compuestos se conocen bien, por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.223.522, 5.132.317, 5.120.754, 5.061.717, 4.897.405, 4.873.255, 4.687.777, 4.572.912, 4.287.200 y 5.002.953; y *Current Pharmaceutical Design* 2: 85-101 (1996). La troglitazona es un agente antihiperoglucémico oral que aumenta el transporte de glucosa posiblemente mediante activación de receptor- γ activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ). Mediante dicha activación, la troglitazona puede potenciar la expresión de transportadores de glucosa GLUT4, dando como resultado aumento de la captación de glucosa estimulada por insulina. La troglitazona también puede atenuar la gluconeogénesis y/o activación de glicolisis.

HbA1c es un ensayo sanguíneo que mide la cantidad de glicosilado que es generalmente más alta cuando un paciente ha experimentado periodos de glucosa en sangre aumentada. El ensayo proporciona una estimación de los últimos 2-3 meses de tratamiento de la diabetes para un paciente. El control glucémico resultante de terapia con troglitazona reduce HbA1c en aproximadamente 1 a 2%. Mimura y col., *Diabetes Med.* 11: 685-91 (1994); Kumar y col., *Diabetologia* 39: 701-09 (1996). Pueden no aparecer efectos durante varias semanas después de comenzar la terapia. La troglitazona también puede reducir los requisitos de insulina. En un ensayo de pacientes con NIDDM y usando insulina exógena, la media de HbA1c bajó en 0,8% y 1,4% para dosis de 200 y 600 mg de Troglitazona, respectivamente. Los requisitos de insulina se redujeron en hasta 29%. Schwartz y col., *New Engl. J. Med.* 338: 861-66 (1998). En otro estudio de diabéticos con NIDDM usando 400 y 600 mg de troglitazona, los niveles de glucosa en ayunas y postprandial se redujeron, y la pinza euglucémica hiperinsulinémica indicó que la evacuación de glucosa estaba aproximadamente 45% por encima de los niveles pretratamiento. Maggs y col., *Ann. Intern. Med.* 128: 176-85 (1998).

En un estudio, 400 mg de troglitazona aumentaron las velocidades de evacuación de glucosa en pacientes obesos con tolerancia a glucosa normal o alterada. Nolan y col., *New Eng. J. Med* 331: 1188-93 (1994). En otro estudio de mujeres con IGT e historial de diabetes gestacional, 600 mg de troglitazona mejoraron la homeostasis de insulina, incluyendo mejora de la sensibilidad a insulina y reducción de las concentraciones de insulina en circulación, pero la tolerancia a glucosa permaneció sin cambios. Berkowitz y col., *Diabetes* 45: 172-79 (1996). Pueden usarse tiazolidinedionas con poblaciones en riesgo de NIDDM, tales como mujeres con POCS o GDM, para prevenir o retardar la aparición de NIDDM. Patente de Estados Unidos N° 5.874.454. Las cantidades eficaces de troglitazona, cuando se usa sola, varían de aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 800 mg por dosis diaria y se contempla un intervalo proporcionado para su uso en la presente invención. Además de usarse con metformina, la troglitazona puede usarse en combinación con insulina y un agente de sulfonilurea. Véase, por ejemplo Patente de Estados Unidos N° 5.859.037.

Las sulfonilureas generalmente actúan reduciendo la glucosa en plasma mediante el aumento de la liberación de insulina desde el páncreas. Específicamente, las sulfonilureas actúan bloqueando los canales de potasio sensibles a ATP. La glimepirida de sulfonilurea también puede aumentar la sensibilidad a insulina estimulando la translocación de transportadores GLUT4. Típicamente se prescriben sulfonilureas cuando HbA1c está por encima del 8%. Véase también Patentes de Estados Unidos N° 5.258.185, 4.873.080.

Las sulfonilureas son una clase de compuestos que se conocen bien en la técnica, por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 3.454.635, 3.669.966, 2.968.158, 3.501.495, 3.708.486, 3.668.215, 3.654.357 y 3.097.242. Las sulfonilureas ejemplares contempladas para su uso en ciertas realizaciones de la presente invención (con dosificaciones diarias típicas indicadas entre paréntesis) incluyen acetohexamida (en el intervalo de aproximadamente 250 hasta aproximadamente 1500 mg), clorpropamida (en el intervalo de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 500 mg), tolazamida (en el intervalo de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1000 mg), tolbutamida (en el intervalo de aproximadamente 500 hasta aproximadamente 3000 mg), gliclazida (en el intervalo de aproximadamente 80 hasta aproximadamente 320 mg), glipizida (en el intervalo de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 40 mg), glipizida GITS (en el intervalo de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 mg), gliburida (en el intervalo de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 mg), gliburida micronizada (en el intervalo de aproximadamente 0,75 hasta aproximadamente 12 mg), glimeperida (en el intervalo de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 8 mg), AG-EE 623 ZW, y similares. La glimepirida es el primer agente antidiabético en esta clase aprobado para su uso con insulina y puede haber menos riesgo de hipoglucemia asociado con su uso.

- Puede usarse una diversidad de inhibidores de alfa glucosidasa con la presente invención para tratar y/o prevenir diabetes. Tales inhibidores inhiben de forma competitiva alfa glucosidasa, que metaboliza carbohidratos, retardando de este modo la absorción de carbohidratos y atenuando la hiperglucemia postprandial. Clissod y col., *Drugs* 35: 214-23 (1988). La reducción de glucosa puede mostrarse a través de niveles de HbA1c reducidos. Los inhibidores de alfa glucosidasa ejemplares contemplados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen acarbosa, miglitol y similares. Las dosificaciones eficaces tanto de acarbosa como de miglitol están en el intervalo de aproximadamente 25 hasta aproximadamente 300 mg diarios.
- Pueden usarse inhibidores de alfa glucosidasa con polipéptidos de la presente invención en combinación con sulfonilureas. Se ha mostrado que los inhibidores de alfa glucosidasa en combinación con sulfonilureas solamente reducen los niveles de HbA1c en general, de aproximadamente 0,5 a 1,0%. Además, se ha mostrado que los inhibidores de alfa glucosidasa son eficaces en la reducción del aumento postprandial de la glucosa en sangre. Lefevre y col., *Drugs* 44: 29-38 (1992).
- Puede usarse una diversidad de derivados de ácido benzoico con polipéptidos de la presente invención para tratar y/o prevenir diabetes. Estos agentes, también conocidos como meglitinidas, son agentes hipoglucémicos no de sulfonilurea que tienen capacidad secretora de insulina. Por ejemplo, la repaglinida parece unirse a canales de potasio sensibles a ATP en células beta pancreáticas y de este modo aumenta la secreción de insulina. Los derivados de ácido benzoico ejemplares contemplados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen repaglinida y similares. Para repaglinida, la dosificación diaria eficaz puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 16 mg, y el agente puede tomarse antes de cada comida.
- Varios agentes se están investigando en la actualidad como antidiabéticos potenciales en seres humanos. Cualquiera de tales agentes puede usarse con polipéptidos de la presente invención para tratamiento y/o prevención de trastornos metabólicos, y en particular de diabetes, si están disponibles para su uso terapéutico.
- Otra categoría de agentes antidiabéticos es la de inhibidores de carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I), tal como etomoxir, que en una realización adicional de la invención pueden usarse con los polipéptidos de FGF-21 modificados para modular la glucosa en sangre. El etomoxir inhibe de forma irreversible la carnitina palmitoil-transferasa I, que es necesaria para oxidación de ácidos grasos. Dicha inhibición puede reducir la hiperglucemia en ayunas, debido a que los productos de oxidación de ácidos grasos estimulan la gluconeogénesis hepática. El etomoxir puede mejorar la sensibilidad a insulina en diabéticos de Tipo 2. Hubinger y col., *Hormone Metab. Res.* 24: 115-18 (1992).
- Pueden mencionarse otros agentes antidiabéticos conocidos que incluyen preparaciones de insulina (por ejemplo, preparaciones de insulina animal extraídas de páncreas de vacas y cerdos; preparaciones de insulina humana sintetizadas genéticamente usando *Escherichia coli*, levadura; insulina de cinc; insulina cinc protamina; fragmento o derivado de insulina (por ejemplo, INS-1), preparación de insulina oral), sensibilizadores de insulina (por ejemplo, pioglitazona o una sal de la misma (preferentemente clorhidrato), rosiglitazona o una sal de la misma (preferentemente maleato), Netoglitazona, Rivoglitazona (CS-011), FK-614, el compuesto descrito en el documento WO01/38325, Tesaglitazar (AZ-242), Ragaglitazar (N,N-622), Muraglitazar (BMS-298585), Edaglitazona (BM-13-1258), Metaglidasen (MBX-102); Naveglitazar (LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921), inhibidores de α -glucosidasa (por ejemplo, voglibosa, acarbosa, miglitol, emiglitato, etc.), biguanidas (por ejemplo, fenformina, metformina, buformina o una sal de las mismas (por ejemplo, clorhidrato, fumarato, succinato)), secretagogos de insulina [sulfonilurea (por ejemplo, tolbutamida, glibenclamida, gliclacida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, gliclopiramida, glimepirida, glipicida, glibuzol), repaglinida, nateglinida, mitiglinida o sal cálcica hidratada de las mismas], inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (por ejemplo, Vidagliptina (LAF237), P32/98, Sitagliptina (MK-431), P93/01, PT-100, Saxagliptina (BMS-477118), T-6666, TS-021), β 3 agonistas (por ejemplo, AJ-9677), agonistas de GPR40, polipéptidos de tipo glucagón (I) (glp 1), (glp2), u otras hormonas peptídicas diabetogénicas, agonistas del receptor de GLP-1 [por ejemplo, GLP-1, agente GLP-1MR, N,N-2211, AC-2993 (exendina-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1 (7,37)NH.sub.2, CJC-[131], agonistas de amilina (por ejemplo, pramlintida), inhibidores de fosfotirosina fosfatasa (por ejemplo, vanadato sódico), inhibidores de gluconeogénesis (por ejemplo, inhibidores de glucógeno fosforilasa, inhibidores de glucosa-6-fosfatasa, antagonistas de glucagón), inhibidores de SGLUT (cotransportador de sodio-glucosa) (por ejemplo, T-1095), inhibidores de 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (por ejemplo, BVT-3498), adiponectina o agonistas de la misma, inhibidores de IKK (por ejemplo, AS-2868), fármacos que mejoran la resistencia a leptina, agonistas del receptor de somatostatina (compuestos descritos en los documentos WO01/25228, WO03/42204, WO98/44921, WO98/45285, WO99/2273.5, etc.), activadores de glucoquinasa (por ejemplo, R.sup.o-28-1675), GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa) y similares.
- El polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no natural, solo o en combinación con otros componentes adecuados, también puede prepararse en formulaciones de aerosol (es decir, puede "nebulizarse") para administrarse mediante inhalación. Pueden ponerse formulaciones de aerosol en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.
- Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo por vías intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones de

- inyección estéril isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las formulaciones de FGF-21 pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales.
- La administración parenteral y la administración intravenosa son procedimientos preferidos de administración. En particular, las vías de administración ya en uso para agentes terapéuticos homólogos de aminoácidos naturales (incluyendo pero sin limitación, los usados típicamente para EPO, GH, G-CSF, GM-CSF, IFN, interleucinas, anticuerpos, FGF, y/o cualquier otra proteína suministrada de forma farmacéutica), junto con formulaciones actualmente en uso, proporcionan vías preferidas de administración y formulación para los polipéptidos de la invención.
- La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, es suficiente para tener una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo, u otra actividad apropiada, dependiendo de la aplicación. La dosis se determina por la eficacia del vector particular, o formulación, y la actividad, estabilidad o semivida en suero del polipéptido de aminoácidos no naturales empleado y la condición del paciente, así como el peso corporal o área superficial del paciente para tratar. El tamaño de la dosis también se determina por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un vector, formulación o similar particular en un paciente particular.
- Al determinar la cantidad eficaz del vector o formulación para administrar en el tratamiento o profilaxis de enfermedad (incluyendo pero sin limitación, cánceres, enfermedades hereditarias, diabetes, SIDA o similares), el médico evalúa los niveles en circulación en plasma, toxicidades de la formulación, progresión de la enfermedad y/o, cuando sea relevante, la producción de anticuerpos anti polipéptido de aminoácidos no naturales.
- La dosis administrada, por ejemplo, a un paciente de 70 kilogramos, está típicamente en el intervalo equivalente a dosificaciones de proteínas terapéuticas usadas en la actualidad, ajustado para la actividad alterada o semivida en suero de la composición relevante. Los vectores o formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden complementar las condiciones de tratamiento por cualquier terapia convencional conocida, incluyendo administración de anticuerpos, administración de vacuna, administración de agentes citotóxicos, polipéptidos de aminoácidos naturales, ácidos nucleicos, análogos de nucleótidos, modificadores de respuesta biológica, y similares.
- Para la administración, las formulaciones de la presente invención se administran a una tasa determinada por la DL-50 o DE-50 de la formulación relevante, y/u observación de cualquier efecto secundario de los polipéptidos de aminoácidos no naturales a diversas concentraciones, incluyendo pero sin limitación como se aplica a la masa y salud global del paciente. La administración puede conseguirse mediante dosis sencillas o divididas.
- Si un paciente que experimenta infusión de una formulación desarrolla fiebres, escalofríos o dolores musculares, el/ella recibe la dosis apropiada de aspirina, ibuprofeno, acetaminofeno u otro fármaco que combata el dolor/la fiebre. Los pacientes que experimentan reacciones a la infusión tales como fiebre, dolores musculares y escalofríos se premedican 30 minutos antes de las infusiones futuras con aspirina, acetaminofeno o, incluyendo pero sin limitación, difenhidramina. Se usa meperidina para dolores musculares y escalofríos más graves que no responden rápidamente a antipiréticos y antihistamínicos. La infusión celular se ralentiza o se detiene dependiendo de la gravedad de la reacción.
- Pueden administrarse polipéptidos de FGF-21 humanos de la invención directamente a un sujeto mamífero. La administración es por cualquiera de las vías usadas normalmente para introducir polipéptido de FGF-21 a un sujeto. Las composiciones de polipéptido de FGF-21 de acuerdo con realizaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, tópica, inhalación (incluyendo pero sin limitación, mediante un aerosol), bucal (incluyendo pero sin limitación, sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo pero sin limitación subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarticular, intrapleural, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial o intravenosa), tópica (es decir, de las superficies tanto cutáneas como mucosas, incluyendo superficies de las vías respiratorias) y transdérmica, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se trate. La administración puede ser local o sistémica. Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales. Pueden prepararse polipéptidos de FGF-21 de la invención en una mezcla en una forma inyectable farmacéutica unitaria (incluyendo pero sin limitación solución, suspensión o emulsión) con un vehículo farmacéuticamente aceptable. También pueden administrarse polipéptidos de FGF-21 de la invención por infusión continua (usando, incluyendo pero sin limitación, mini bombas tales como bombas osmóticas), formulaciones de depósito de liberación lenta o embolada sencilla.
- Las formulaciones adecuadas para administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen a la formulación isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Pueden prepararse soluciones y suspensiones a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

La liofilización es una técnica empleada habitualmente para presentar proteínas que sirve para retirar agua de la preparación proteica de interés. La liofilización, o secado por congelación, es un procedimiento por el que el material para secar se congela en primer lugar y después se retira el hielo o disolvente congelado por sublimación en un ambiente en vacío. Puede incluirse un excipiente en formulaciones preliofilizadas para potenciar la estabilidad durante el procedimiento de liofilización y/o mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento. Pikal, M. *Biopharm.* 3(9)26-30 (1990) y Arakawa y col. *Pharm. Res.* 8(3): 285-291 (1991).

También se conoce por los expertos habituales en la materia el secado por pulverización de productos farmacéuticos. Por ejemplo, véase Broadhead, J. y col., "The Spray Drying of Pharmaceuticals," en *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992). Además de productos farmacéuticos de moléculas pequeñas, se ha secado por pulverización una diversidad de materiales biológicos y estos incluyen: enzimas, sueros, plasma, microorganismos y levaduras. El secado por pulverización es una técnica útil debido a que puede convertir una preparación farmacéutica líquida en partículas finas, sin polvo o aglomeradas en un procedimiento de una etapa. La técnica básica comprende las siguientes cuatro etapas: a) atomización de la solución de suministro en un pulverizador; b) contacto pulverizador-aire; c) secado de la pulverización; y d) separación del producto secado a partir del aire de secado. Las Patentes de Estados Unidos N° 6.235.710 y 6.001.800 describen la preparación de eritropoyetina recombinante por secado por pulverización.

Las composiciones farmacéuticas y formulaciones de la invención pueden comprender un vehículo, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable. Se determinan vehículos farmacéuticamente aceptables en parte por la composición particular que se administra así como por el procedimiento particular usado para administrar la composición. En consecuencia, hay una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas (incluyendo vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales) de la presente invención (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed. 1985)).

Los vehículos adecuados incluyen pero sin limitación, tampones que contienen succinato, fosfato, borato, HEPES, citrato, histidina, imidazol, acetato, bicarbonato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen pero sin limitación, ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular incluyendo pero sin limitación los de menos de aproximadamente 10 restos; proteínas, incluyendo pero sin limitación, albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos incluyendo pero sin limitación, polivinilpirrolidona; aminoácidos incluyendo pero sin limitación, glicina, glutamina, asparagina, arginina, histidina o derivados de histidina, metionina, glutamato o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo pero sin limitación, trehalosa, sacarosa, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes incluyendo pero sin limitación, EDTA y edetato disódico; iones metálicos divalentes incluyendo pero sin limitación, cinc, cobalto o cobre; alcoholes de azúcares incluyendo pero sin limitación, manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales incluyendo pero sin limitación, sodio y cloruro sódico; y/o tensioactivos no iónicos incluyendo pero sin limitación Tween 80 (polisorbato 80) y Tween 20 (polisorbato 20), Pluronic[™] y otros ácidos plurónicos, incluyendo pero sin limitación, ácido plurónico F68 (poloxámero 188) o PEG. Los tensioactivos adecuados incluyen por ejemplo pero sin limitación poliéteres basados en poli(etilen óxido)-poli(propilen óxido)-poli(etilen óxido), es decir, (PEO-PPO-PEO), o poli(propilen óxido)-poli(etilen óxido)-poli(propilen óxido), es decir, (PPO-PEO-PPO), o una combinación de los mismos. PEO-PPO-PEO y PPO-PEO-PPO están disponibles en el mercado con los nombres comerciales Pluronic[™], R-Pluronic[™], Tetronics[™] y R-Tetronics[™] (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.) y se describen adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N° 4.820.352. Otros polímeros en bloque de etileno/polipropileno pueden ser tensioactivos adecuados. Un tensioactivo o una combinación de tensioactivos pueden usarse para estabilizar FGF-21 PEGilado frente a una o más tensiones incluyendo pero sin limitación tensión que resulta de agitación. Algunos de los anteriores pueden denominarse "agentes de masificación". Algunos también pueden denominarse "modificadores de tonicidad". También pueden aplicarse conservantes antimicrobianos para estabilidad del producto y eficacia antimicrobiana; los conservantes adecuados incluyen pero sin limitación, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, metacresol, metil/propil parabeno, cresol y fenol, o una combinación de los mismos.

Los polipéptidos de FGF-21 de la invención unidos a polímeros solubles en agua tales como PEG también pueden administrarse por o como parte de sistemas de liberación prolongada. Las composiciones de liberación prolongada incluyen, incluyendo pero sin limitación, matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos moldeados, incluyendo pero sin limitación, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación prolongada incluyen de materiales biocompatibles tales como poli(2-hidroxietil metacrilato) (Langer y col., *J. Biomed Mater. Res.*, 15: 267-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), etilen vinil acetato (Langer y col., mencionado anteriormente) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988), polilactidas (ácido poliláctico) (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919; documento EP 58.481), poliglicolida (polímero de ácido glicólico), polianhídridos de polilactida co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman y col., *Biopolymers*, 22, 547-556 (1983)), poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, condroitín sulfato, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona y silicona. Las composiciones de liberación prolongada también incluyen un compuesto inmovilizado en liposomas. Se preparan liposomas que contienen el compuesto por procedimientos conocidos por sí mismos: documento DE 3.218.121; Eppstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980); documentos EP52.322; EP36.676; Patente de Estados Unidos N° 4.619.794; documento EP143.949; Patente de Estados Unidos N° 5.021.234; Solicitud de Patente

Japonesa 83-118008; Patentes de Estados Unidos Nº 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324.

Pueden prepararse polipéptidos de FGF-21 inmovilizados en liposomas por procedimientos descritos en, por ejemplo, el documento DE 3.218.121; Eppstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 3688-3692 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 4030-4034 (1980); documentos EP 52.322; EP36.676; Patente de Estados Unidos Nº 4.619.794; documento EP 143.949; Patente de Estados Unidos Nº 5.021.234; Solicitud de Patente Japonesa 83-118008; Patentes de Estados Unidos Nº 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. La composición y tamaño de los liposomas se conocen bien o pueden determinarse fácilmente de forma empírica por un experto habitual en la materia. Algunos ejemplos de liposomas se describen en, por ejemplo, Park JW, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1327-1331 (1995); Lasic D y Papahadjopoulos D (eds): MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES (1998); Drummond DC, y col., Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, en Teicher B (ed): CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT (2002); Park JW, y col., Clin. Cancer Res. 8: 1172-1181 (2002); Nielsen UB, y col., Biochim. Biophys. Acta 1591(1-3):109-118 (2002); Mamot C, y col., Cancer Res. 63: 3154-3161 (2003).

La dosis administrada a un paciente en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para provocar una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo. En general, la cantidad total farmacéuticamente eficaz del polipéptidos FGF-21 de la presente invención administrado por vía parenteral por dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,01 µg/kg/día a aproximadamente 100 µg/kg, o de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de peso corporal del paciente, aunque esto está sujeto al criterio terapéutico. La frecuencia de dosificación también está sujeta al criterio terapéutico, y puede ser más frecuente o menos frecuente que los productos de polipéptidos de FGF-21 disponibles en el mercado aprobados para su uso en seres humanos. En general, puede administrarse un polipéptido de FGF-21 PEGilado de la invención por cualquiera de las vías de administración descritas anteriormente.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de FGF-21 modificados de la presente invención modulan el efecto de un agente antidiabético. En otra realización de la presente divulgación, los polipéptidos de FGF-21 modificados pueden coadministrarse con un agente antidiabético. En otra realización de la presente divulgación pueden administrarse polipéptidos de FGF-21 modificados antes del tratamiento con un agente antidiabético. En otra realización de la presente divulgación, pueden administrarse polipéptidos de FGF-21 modificados después del tratamiento con un agente antidiabético. En otra realización de la presente divulgación, se coadministran polipéptidos de FGF-21 modificados con metformina. En otra realización de la presente divulgación, el tratamiento terapéutico con polipéptidos de FGF-21 modificados de la invención y metformina aumenta la capacidad de la metformina para modular la glucosa en plasma, en presencia o ausencia de insulina. En terapia de combinación, se ha usado metformina con sulfonilureas, inhibidores de alfa glucosidasa, troglitazona e insulina. La metformina combinada con una sulfonilurea aumenta la sensibilidad a insulina y puede reducir la glucosa en plasma. Como alternativa, la metformina con repaglinida puede ser más eficaz que glipizida, y al menos tan eficaz como gliburida, en el mantenimiento del control glucémico durante muchos meses. La metformina con troglitazona mejora el control de la glucosa en exceso de uno de los agentes solamente. Inzucchi y col., New. Eng. J. Med. 338: 867-72 (1998). En algunas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención se coadministran con Klotho beta. En algunas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención se coadministran con Klotho beta que incluye uno o más aminoácidos no codificados de forma natural. En algunas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención se coadministran con Klotho beta y un agente antidiabético. En algunas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención se coadministran con un agente antidiabético. En algunas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención se usan en combinación con uno o más de los siguientes: Taurina, Ácido Alfa Lipoico, un extracto de Moras, Cromo, Glutamina, *Enicostemma littorale Blame*, *Scoparia dulcis*, un extracto de Estragón y *Andrographis paniculata*. En algunas realizaciones de la divulgación, se usan polipéptidos de FGF-21 de la presente invención en combinación con uno o más de los siguientes: preparaciones de insulina (por ejemplo, preparaciones de insulina animal extraídas de páncreas de vacas y cerdos; preparaciones de insulina humana sintetizadas genéticamente usando *Escherichia coli*, levadura; insulina de cinc; insulina cinc protamina; fragmento o derivado de insulina (por ejemplo, INS-1), preparación de insulina oral), sensibilizadores de insulina (por ejemplo, pioglitazona o una sal de la misma (preferentemente clorhidrato), rosiglitazona o una sal de la misma (preferentemente maleato), Netoglitazona, Rivoglitazona (CS-011), FK-614, el compuesto descrito en el documento WO01/38325, Tesaglitazar (AZ-242), Ragaglitazar (N,N-622), Muraglitazar (BMS-298585), Edaglitazona (BM-13-1258), Metaglidasen (MBX-102); Naveglitazar (LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921), inhibidores de α -glucosidasa (por ejemplo, voglibosa, acarbosa, miglitol, emiglitalo, etc.), biguanidas (por ejemplo, fenformina, metformina, buformina o una sal de las mismas (por ejemplo, clorhidrato, fumarato, succinato)), secretagogos de insulina [sulfonilurea (por ejemplo, tolbutamida, glibenclamida, gliclazida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, gliclopiramida, glimepirida, glipizida, glibuzol), repaglinida, nateglinida, mitiglinida o hidrato de sal cálcica de las mismas], inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (por ejemplo, Vidagliptina (LAF237), P32/98, Sitagliptina (MK-431), P93/01, PT-100, Saxagliptina (BMS-477118), T-6666, TS-021), .beta.3 agonistas (por ejemplo, AJ-9677), agonistas de GPR40, polipéptidos de tipo glucagón (I) (glp1), (glp2), u otras hormonas peptídicas diabéticas, agonistas del receptor de GLP-1 [por ejemplo, GLP-1, agente GLP-1MR, N,N-2211, AC-2993 (exendina-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1 (7,37)NH.sub.2, CJC-[131], agonistas de amilina (por ejemplo, pramlintida), inhibidores de fosfotirosina fosfatasa (por ejemplo, vanadato sódico), inhibidores de gluconeogénesis

(por ejemplo, inhibidores de glucógeno fosforilasa, inhibidores de glucosa-6-fosfatasa, antagonistas de glucagón), inhibidores de SGLUT (cotransportador de sodio-glucosa) (por ejemplo, T-1095), inhibidores de 11.beta.-hidroxiesteroide deshidrogenasa (por ejemplo, BVT-3498), adiponectina o agonistas de la misma, inhibidores de IKK (por ejemplo, AS-2868), fármacos que mejoran la resistencia a leptina, agonistas del receptor de somatostatina (compuestos descritos en los documentos WO01/25228, WO03/42204, WO98/44921, WO98/45285, WO99/2273.5 etc.), activadores de glucoquinasa (por ejemplo, R.sup.o-28-1675), GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa).

En algunas realizaciones de la divulgación, se usan polipéptidos de la presente invención en combinación con potenciadores de insulina tales como, incluyendo pero sin limitación, Taurina, Ácido Alfa Lipoico, un extracto de Mora, Cromo, Glutamina, *Enicostemma littorale Blume*, *Scoparia dulcis*, un extracto de Estragón y *Andrographis paniculata*. En otra realización, la presente divulgación puede comprender uno o más de Isomalta, Trehalosa o D-Manosa para potenciar adicionalmente la secreción o actividad de insulina. En una realización adicional de la divulgación, el potenciador de insulina y polipéptidos de la presente invención se usan además de otro agente antidiabético.

Un modo por el que puede determinarse la eficacia terapéutica de los polipéptidos y terapias combinadas incluyendo los polipéptidos de la presente invención es a través de una reducción en los niveles de HbA1c en el paciente. En una realización, los polipéptidos de la presente invención reducen los niveles de HbA1c en al menos un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11 %, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, o al menos 50% de cambio desde los niveles de HbA1c dos meses antes de comenzar la terapia con polipéptidos de FGF-21 modificados, desde tres meses antes de comenzar la terapia con polipéptidos de FGF-21 modificados, o por cambios de porcentajes desde una línea basal. En otra realización, los polipéptidos de la presente invención administrados a un paciente que también se trata con un agente antidiabético modulan la capacidad del agente antidiabético para reducir la glucosa en sangre. En otra realización, los polipéptidos de la presente invención administrados a un paciente que también se trata con un agente antidiabético reducen los niveles de HbA1c en al menos un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, o al menos 50% de cambio desde los niveles de HbA1c dos meses antes de comenzar la terapia con polipéptidos de FGF-21 modificados, desde tres meses antes de comenzar la terapia con polipéptidos de FGF-21 modificados o por cambios de los porcentajes desde una línea basal o desde una línea basal de pretratamiento.

En otra realización, los polipéptidos de FGF-21 modificados de la presente invención modulan la capacidad de troglitazona para reducir los requisitos de insulina. En otra realización, realización adicional, los polipéptidos de FGF-21 modificados de la presente invención cuando se administran a un paciente que se trata con troglitazona reducen adicionalmente los requisitos de insulina de dicho paciente. La troglitazona usada en combinación con la presente invención puede usarse para retardar o prevenir diabetes de Tipo 2 en ciertas realizaciones de la presente invención.

En una realización de la presente divulgación se coadministran polipéptidos de FGF-21 modificados con una sulfonilurea. En otra realización de la presente divulgación, se administran polipéptidos de FGF-21 modificados antes del tratamiento con una sulfonilurea. En otra realización de la presente divulgación, se administran polipéptidos de FGF-21 modificados después de tratamiento con una sulfonilurea. En algunas realizaciones de la presente divulgación, el tratamiento con una dosis terapéutica de polipéptidos de FGF-21 modificados modula la glucosa en suero. En otra realización de la divulgación, los polipéptidos de FGF-21 de la presente invención se administran con Klotho beta que modula los efectos de los polipéptidos en la glucosa en sangre. En otra realización de la divulgación, se administran polipéptidos de FGF-21 de la presente invención con Klotho beta que reduce la glucosa en sangre más que el uso de polipéptidos de FGF-21 modificados solos. En otra realización de la divulgación estos cambios se miden usando ensayos de HbA1c. En otra realización de la divulgación, se administran polipéptidos de FGF-21 de la presente invención y Klotho beta a un paciente que se trata con un agente antidiabético que reduce la glucosa en sangre más que el uso del agente antidiabético solo.

XV. Usos terapéuticos de polipéptidos de FGF 21 de la invención

Los polipéptidos de FGF-21 de la invención son útiles para tratamiento de una amplia serie de trastornos.

Los polipéptidos de FGF-21 de la invención pueden usarse para tratar mamíferos que padecen Diabetes Mellitus no insulino dependiente (NIDDM: Tipo 2), diabetes insulino dependiente (Tipo 1), así como obesidad, eliminación de glucosa inadecuada, hiperglicemia, hiperinsulinemia, y cualquier otra enfermedad o afección que pueda mediarse por FGF-21. La intolerancia a glucosa puede definirse como una sensibilidad excepcional a la glucosa. La hiperglicemia se define como un exceso de azúcar (glucosa) en la sangre. La hiperinsulinemia se define como un nivel más alto que el normal de insulina en la sangre. La resistencia a insulina se define como un estado en el que una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica por debajo de lo normal. La obesidad, con respecto al sujeto humano, puede definirse como el peso corporal por encima del 20 por ciento sobre el peso corporal ideal para una población dada (R. H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, p.904-916).

La diabetes mellitus se caracteriza por dos grupos amplios basándose en manifestaciones clínicas, concretamente,

la forma de aparición en madurez o no insulino dependiente, también conocida como de Tipo 2; y la forma de aparición juvenil o insulino dependiente, también conocida como de Tipo 1. Clínicamente, la mayoría de los diabéticos de aparición en la madurez, de Tipo 2, son obesos, con manifestaciones de síntomas clínicos de la enfermedad que aparecen habitualmente a una edad por encima de 40. Por el contrario, los pacientes con aparición juvenil, de Tipo 1, no tienen sobrepeso con respecto a su edad y altura, con aparición rápida de la enfermedad a una edad temprana, con frecuencia antes de los 30, aunque la diabetes de Tipo 1 puede aparecer a cualquier edad.

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en seres humanos con una prevalencia de aproximadamente 1% en la población general, siendo un cuarto de estos del Tipo 1 (Foster, D. W., Harrison's Principles of Internal Medicine, Chap. 114, pp. 661-678, 10ª Ed., McGraw-Hill, Nueva York). La enfermedad se manifiesta como una serie de anomalías metabólicas inducidas por hormonas que con el tiempo conducen a complicaciones graves, a largo plazo y debilitantes que implican varios sistemas orgánicos incluyendo los ojos, riñones, nervios y vasos sanguíneos. Patológicamente, la enfermedad se caracteriza por lesiones de las membranas basales, demostrables con microscopía electrónica.

La Diabetes Mellitus no insulino dependiente (NIDDM: Tipo 2) es una enfermedad debilitante caracterizada por altos niveles de glucosa, insulina y corticosteroides en circulación en sangre. La incidencia de la diabetes de Tipo 2 es alta y creciente y se está convirtiendo en una causa principal de mortalidad, morbilidad y gastos sanitarios en todo el mundo (Amos y col., Diabetic Med. 14: S1-85, 1997).

Las causas de la diabetes de Tipo 2 no se entienden bien. La diabetes de Tipo 2 se caracteriza por exceso de producción de glucosa a pesar de la disponibilidad de insulina, y los niveles de glucosa en circulación permanecen excesivamente altos como resultado de la eliminación de glucosa inadecuada. Se cree que se producen tanto resistencia de los tejidos diana a la acción de la insulina como secreción de insulina reducida ("insuficiencia de linfocitos β "). Son tejidos sensibles a insulina importantes para la homeostasis de glucosa el hígado, en el que la insulina estimula síntesis de glicógeno e inhibe la gluconeogénesis; músculo, en el que la insulina estimula captación de glucosa y el glicógeno estimula la captación de glucosa e inhibe la lipólisis. Por lo tanto, como consecuencia de la condición diabética, hay niveles elevados de glucosa en sangre, y alto azúcar en sangre prolongado lo que es indicativo de una afección que provocará daño de los vasos sanguíneos y los nervios.

En la actualidad, existen diversos enfoques farmacológicos para el tratamiento de diabetes de Tipo 2 (Scheen y col., Diabetes Care, 22(9): 1568-1577, 1999). Estos actúan mediante diferentes modos de acción: 1) las sulfonilureas esencialmente estimulan la secreción de insulina; 2) las biguanidas (metformina) actúan promoviendo la utilización de glucosa, reduciendo la producción de glucosa hepática y disminuyendo la salida de glucosa intestinal; 3) los inhibidores de α -glucosidasa (acarbose, miglitol) ralentizan la digestión de carbohidratos y en consecuencia la absorción desde el intestino y reducen la hiperglucemia postprandial; 4) las tiazolidinedionas (troglitazona) potencian la acción de la insulina, promoviendo de este modo la utilización de glucosa en tejidos periféricos; y 5) la insulina estimula la utilización de glucosa tisular e inhibe la producción de glucosa hepática. Los enfoques farmacológicos anteriormente mencionados pueden utilizarse individualmente o en terapia de combinación. Sin embargo, cada enfoque tiene sus limitaciones y efectos adversos.

La obesidad es una enfermedad crónica que es altamente prevalente en la sociedad moderna y se asocia no solamente con un estigma social, sino también con una reducción de la esperanza de vida y numerosos problemas médicos incluyendo desarrollo psicológico adverso, trastornos dermatológicos tales como infecciones, venas varicosas, intolerancia al ejercicio, diabetes mellitus, resistencia a insulina, hipertensión, hipercolesterolemia y enfermedad cardíaca coronaria. Rissanen y col., British Medical Journal, 301: 835-837 (1990).

Las terapias existentes para obesidad incluyen dietas convencionales y ejercicio, dietas muy bajas en calorías, terapia conductual, farmacoterapia que implica supresores del apetito, fármacos termogénicos, inhibidores de la absorción de alimentos, dispositivos mecánicos tales como fijación de mandíbula, globos y cordones de cintura y cirugía. Jung y Chong, Clinical Endocrinology, 35: 11-20 (1991); Bray, Am. J. Clin. Nutr., 55: 538S-544S (1992).

Considerando la alta prevalencia de la obesidad en nuestra sociedad y las graves consecuencias asociadas con la misma como se ha analizado anteriormente, cualquier fármaco terapéutico potencialmente útil en la reducción del peso de personas obesas podría tener un profundo efecto beneficioso en su salud. Existe la necesidad de la técnica de un fármaco que reduzca el peso total de sujetos obesos hacia su peso corporal ideal sin efectos secundarios adversos significativos y eso ayudará a que el sujeto obeso mantenga el nivel de peso reducido.

Es por lo tanto deseable proporcionar un régimen de tratamiento que sea útil para devolver el peso corporal de sujetos obesos a un peso corporal ideal normal. Es deseable además proporcionar una terapia para obesidad que dé como resultado mantenimiento del peso corporal reducido durante un periodo prolongado de tiempo.

La obesidad se correlaciona en gran medida con resistencia a insulina y diabetes en animales experimentales y seres humanos. De hecho, la obesidad y resistencia a insulina, la segunda de las cuales se acompaña generalmente de hiperinsulinemia o hiperglucemia, o ambas, son distintivos de la diabetes de Tipo 2. Además, la diabetes de Tipo 2 se asocia con un riesgo de dos a cuatro veces de enfermedad de las arterias coronarias. A pesar de décadas de investigación sobre estos problemas de salud graves, la etiología de la obesidad y resistencia a insulina se

desconoce.

5 Los diabéticos de Tipo 1 característicamente muestran insulina en plasma muy baja o no medible con glucagón elevado. Independientemente de cuál sea la etiología exacta, la mayoría de los pacientes de Tipo 1 tienen anticuerpos en circulación dirigidos contra sus propias células pancreáticas incluyendo anticuerpos para insulina, para citoplasma de células de islote de Langerhans y para enzima ácido glutámico descarboxilasa. Una respuesta inmune dirigida específicamente contra células beta (células que producen insulina) conduce a diabetes de Tipo 1. Esta especificidad está apoyada por el cuadro clínico anterior, puesto que las células beta secretan insulina mientras que las células alfa secretan glucagón.

10 Los regímenes terapéuticos actuales para diabetes de Tipo 1 incluyen modificaciones de la dieta para minimizar la hiperglucemia resultante de la falta de insulina natural, que a su vez, es el resultado de células beta dañadas. La dieta también se modifica con respecto a administración de insulina para contrarrestar los efectos hipoglucémicos de la hormona. Sea cual sea la forma de tratamiento, se requiere administración parenteral de insulina para todos los diabéticos de Tipo 1, de ahí el término diabetes "insulino-dependiente".

15 Por tanto, existe la necesidad de una terapia eficaz para diabetes de Tipo 2 que tenga menos efectos adversos que los enfoques farmacéuticos disponibles. Además, podría ser útil una terapia eficaz alternativa a la insulina para tratamiento de diabetes de Tipo 1. La presente divulgación proporciona una terapia farmacológica que estimula la captación de glucosa y potencia la sensibilidad a insulina en tejidos periféricos y tiene menos efectos adversos que los regímenes de tratamiento actuales para diabetes de Tipo 1. Además, la presente divulgación proporciona un tratamiento alternativo para diabetes de Tipo 1. Además, la presente invención es útil para tratar obesidad aumentando el gasto de energía por utilización de glucosa más rápida y más eficaz.

La presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un mamífero que muestra una o más de diabetes de Tipo 1, diabetes de Tipo 2, obesidad, resistencia a insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa o hiperglucemia, que comprende administrar a dicho mamífero que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de FGF-21 de la invención.

25 El procedimiento de tratamiento puede ser suficiente para conseguir en dicho mamífero al menos una de las siguientes modificaciones: reducción de almacenes de grasa corporal, reducción de resistencia a insulina, reducción de hiperinsulinemia, aumento de la tolerancia a la glucosa y reducción de la hiperglucemia.

30 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para tratar a un animal doméstico incluyendo pero sin limitación, vacas, cerdos, ovejas, caballos y similares, que comprende administrar una cantidad eficaz de FGF-21 o variante del mismo, para reducir los almacenes de grasa corporal. La reducción de almacenes de grasa corporal a largo plazo o de forma permanente en animales domésticos supondría obviamente un beneficio económico considerable para el hombre, particularmente puesto que los animales proporcionan una parte importante de la dieta del hombre; y la grasa animal puede terminar como depósitos de grasa nuevos en el hombre.

35 Puede usarse el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) para reducir la morbilidad y mortalidad asociadas con pacientes críticos. Véase la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20050176631. Los pacientes críticos que requieren cuidados intensivos durante un periodo prolongado de tiempo tienen un alto riesgo de muerte y mortalidad sustancial. Una causa habitual para la admisión de pacientes a las unidades de cuidados intensivos (UCI) es síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) asociado con lesiones infecciosas (sepsis) así como causas patológicas no infecciosas tales como pancreatitis, isquemia, lesión tisular y traumatismo múltiple, choque hemorrágico, y lesión de órganos mediada por sistema inmune. La presente divulgación también abarca un procedimiento para reducir la mortalidad y morbilidad en pacientes críticos que padecen síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) asociado con lesiones infecciosas así como causas patológicas no infecciosas que comprende administrar a los pacientes críticos una cantidad terapéuticamente eficaz de FGF-21. Los ejemplos de condiciones que implican SRIS incluyen sepsis, pancreatitis, isquemia, lesión tisular y traumatismo múltiple, choque hemorrágico, lesión de órganos mediada por sistema inmune, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), choque, insuficiencia renal y síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS). La presente divulgación también abarca un procedimiento para reducir la mortalidad y morbilidad en pacientes críticos que padecen dificultad respiratoria.

50 Una complicación frecuente de SRIS es el desarrollo de disfunción sistémica orgánica incluyendo síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), choque, insuficiencia renal y síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS), todos los cuales amplifican el riesgo de un resultado adverso. Aunque muchos especialistas creen que algún tipo de soporte nutricional es beneficioso para pacientes críticos para ayudar a restablecer la estabilidad metabólica, los beneficios y los detalles de dicho soporte siguen siendo controvertidos debido a la falta de ensayos clínicos aleatorios bien controlados.

55 Debido a que la hiperglucemia y resistencia a insulina son habituales en pacientes críticos a los que se proporciona apoyo nutricional, algunas UCI administran insulina para tratar hiperglucemia excesiva en pacientes críticos alimentados. De hecho, recientes estudios documentan que el uso de insulina exógena para mantener la glucosa en sangre a un nivel no mayor de 110 mg por decilitro redujo la morbilidad y mortalidad entre pacientes críticos en la

unidad de cuidados intensivos quirúrgica, independientemente de si tenían un historial de diabetes (Van den Berghe, y col. N Engl J Med., 345(19): 1359, 2001).

5 La presente divulgación abarca un procedimiento para reducir la mortalidad y morbilidad en estos pacientes críticos a través de la administración de FGF-21. Los pacientes críticos abarcados por la presente invención generalmente experimentan un estado hipermetabólico inestable. Este estado metabólico inestable se debe a cambios en el metabolismo de sustratos que puede conducir a deficiencias relativas en algunos nutrientes. En general hay una oxidación aumentada tanto de grasa como de músculo.

10 Los pacientes críticos en los que la administración de FGF-21 puede reducir el riesgo de mortalidad y morbilidad son preferentemente pacientes que experimentan síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o dificultad respiratoria. Una reducción de la morbilidad significa reducir la probabilidad de que un paciente crítico desarrolle enfermedades, afecciones o síntomas adicionales o reducir la gravedad de enfermedades, afecciones o síntomas adicionales. Por ejemplo la reducción de la morbilidad puede corresponder a una reducción de la incidencia de bacteriemia o sepsis o complicaciones asociadas con insuficiencia orgánica múltiple.

15 El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) describe un proceso inflamatorio asociado con un gran número de afecciones clínicas e incluye, pero sin limitación, más de una de las siguientes manifestaciones clínicas: (1) una temperatura corporal mayor de 38 °C o menor de 36 °C; (2) un ritmo cardíaco mayor de 90 latidos por minuto; (3) taquipnea manifestada por una frecuencia respiratoria mayor de 20 respiraciones por minuto, o hiperventilación, como se indica por un PaCO₂ de menos de 32 mm de mercurio; y (4) una alteración en el conteo de glóbulos blancos, tal como un conteo mayor de 12.000/cu mm, un conteo menor de 4.000/cu mm, o la presencia de
20 más de 10% de neutrófilos inmaduros. Estos cambios fisiológicos representarían una alteración aguda desde la línea basal en ausencia de otras causas conocidas para tales anomalías, tales como quimioterapia, neutropenia inducida y leucopenia.

25 La sepsis se define como un SRIS que surge de infección. Las causas patógenas no infecciosas de SRIS pueden incluir pancreatitis, isquemia, lesión tisular y traumatismo múltiple, incluyendo pero sin limitación, lesiones por aplastamiento o quemaduras graves, choque hemorrágico, lesión orgánica mediada por el sistema inmune y la administración exógena de tales mediadores potenciales del proceso inflamatorio como factor de necrosis tumoral y otras citocinas.

30 El choque séptico y la disfunción orgánica múltiple son importantes contribuyentes a la morbilidad y mortalidad en el ambiente de la UCI. La sepsis se asocia con y está mediada por la activación de varios mecanismos de defensa del huésped incluyendo la red de citocinas, leucocitos y la cascada de complemento, y sistemas de coagulación/fibrolisis que incluyen el endotelio. La coagulación intravascular diseminada (DIC) y otros grados de coagulopatía de consumo asociados con deposición de fibrina dentro de la microvasculatura de diversos órganos, son manifestaciones de sepsis/choque séptico. Los efectos corriente abajo de la respuesta de defensa del huésped en
35 órganos diana es un mediador importante en el desarrollo del síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS) y contribuye al mal pronóstico de pacientes con sepsis, sepsis grave y sepsis complicada por choque.

40 La dificultad respiratoria indica una afección en la que los pacientes tienen dificultad al respirar debido a algún tipo de disfunción pulmonar. Con frecuencia estos pacientes muestran diversos grados de hipoxemia que puede o no ser refractaria para tratamiento con oxígeno complementario. Puede producirse dificultad respiratoria en pacientes con función pulmonar alterada debido a lesión directa en el pulmón o puede producirse debido a lesión indirecta en el pulmón tal como en la situación de un proceso sistémico. Además, la presencia de múltiples trastornos de predisposición aumenta sustancialmente el riesgo, así como la presencia de factores secundarios tales como consumo excesivo de alcohol crónico, enfermedad pulmonar crónica y un pH en suero bajo.

45 Algunas causas de lesión directa del pulmón incluyen neumonía, aspiración de los contenidos gástricos, contusión pulmonar, embolia grasa, casi ahogamiento, lesión de inhalación, alta altitud y edema pulmonar por reperfusión después de trasplante de pulmón o embolectomía pulmonar. Algunas causas de lesión directa de pulmón incluyen sepsis, traumatismo grave con choque y transfusiones múltiples; derivación cardiopulmonar, sobredosis de drogas, pancreatitis aguda y transfusiones de productos sanguíneos.

50 Una clase de trastornos pulmonares que provocan dificultades respiratorias se asocia con el síndrome conocido como Corazón Pulmonal. Estos trastornos se asocian con hipoxemia crónica que da como resultado aumento de la presión dentro de la circulación pulmonar llamada hipertensión pulmonar. La hipertensión pulmonar consiguiente aumenta la carga de trabajo del ventrículo derecho conduciendo de este modo a su agrandamiento o hipertrofia. El Corazón Pulmonal generalmente se presenta como insuficiencia cardíaca derecha definida por un aumento prolongado en las presiones del ventrículo derecho y pruebas clínicas de retorno venoso reducido al corazón derecho.

55 Las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) que incluyen enfisema y bronquitis crónica también provocan dificultad respiratoria y se caracterizan por obstrucción del flujo de aire. Las EPOC son la cuarta causa de muerte principal y se cobran más de 100.000 vidas anualmente.

El síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) es generalmente progresivo y se caracteriza por distintas

etapas. El síndrome en general se manifiesta por la aparición rápida de insuficiencia respiratoria en un paciente con factor de riesgo para la afección. La hipoxemia arterial que es refractaria a tratamiento con oxígeno complementario es un elemento característico. Puede haber llenado alveolar, consolidación y atelectasia que se produce en zonas del pulmón dependientes; sin embargo, las áreas no dependientes pueden tener inflamación sustancial. El síndrome puede progresar a alveolitis fibrosa con hipoxemia persistente, aumento del espacio muerto alveolar y una reducción adicional de la distensibilidad pulmonar. También puede desarrollarse hipertensión pulmonar que resulta de daño al lecho capilar pulmonar.

La gravedad de la lesión pulmonar clínica varía. Tanto los pacientes con hipoxemia menos grave como se define por una relación de la presión parcial de oxígeno arterial con la fracción de oxígeno inspirado de 300 o menos como pacientes con hipoxemia más grave definida por una relación de 200 o menos están abarcados por la presente invención. En general, los pacientes con una relación de 300 o menos se clasifican como con lesión pulmonar aguda y los pacientes con una relación de 200 o menos se clasifican como con síndrome de dificultad respiratoria aguda.

La fase aguda de la lesión pulmonar aguda se caracteriza por un flujo de entrada de fluido de edema rico en proteínas en los espacios aéreos como consecuencia de permeabilidad vascular aumentada de la barrera alveolar-capilar. La pérdida de integridad epitelial en la que se altera la permeabilidad puede provocar inundación alveolar, interrumpir el transporte de fluidos normal que afecta a la retirada de fluido de edema del espacio alveolar, reducir la producción y renovación de tensioactivo, conducir a choque séptico en pacientes con neumonía bacteriana y provocar fibrosis. La sepsis se asocia con el riesgo más alto de progresión a lesión pulmonar aguda.

En afecciones tales como sepsis, cuando se produce hipermetabolismo, hay una descomposición de proteínas acelerada tanto para mantener la gluconeogénesis como para liberar los aminoácidos requeridos para síntesis de proteína aumentada. Puede estar presente hiperglucemia y pueden estar presentes altas concentraciones de triglicéridos y otros lípidos en suero.

Para pacientes con función respiratoria deteriorada, el hipermetabolismo puede afectar a la relación de la producción de dióxido de carbono y de consumo de oxígeno. Esta se conoce como el cociente respiratorio (R/Q) y en individuos normales está entre aproximadamente 0,85 y aproximadamente 0,90. El metabolismo de grasa en exceso tiene tendencia a reducir el R/Q mientras que el metabolismo de glucosa en exceso eleva el R/Q. Los pacientes con dificultad respiratoria con frecuencia tienen dificultad eliminado dióxido de carbono y por lo tanto tienen cocientes respiratorios anormalmente altos.

Los pacientes críticos abarcados por la presente invención también experimentan en general una respuesta de tensión particular caracterizada por una regulación negativa transitoria de la mayoría de los productos celulares y la regulación positiva de proteínas de choque térmico. Además, esta respuesta de tensión implica la activación de hormonas tales como glucagón, hormona del crecimiento, cortisol y citocinas pro- y anti-inflamatorias. Aunque esta respuesta de tensión parece tener una función protectora, la respuesta crea inestabilidad metabólica adicional en estos pacientes críticos. Por ejemplo, la activación de estas hormonas específicas provoca elevaciones de la glucosa en suero que dan como resultado hiperglucemia. Además, el daño al corazón y otros órganos puede agravarse por estímulos adrenérgicos. Además, puede haber cambios en el tiroides que pueden tener efectos significativos en la actividad metabólica.

Las cantidades medias del FGF-21 pueden variar y en particular deberían basarse en las recomendaciones y prescripción de un médico cualificado. La cantidad exacta de FGF-21 depende de la preferencia sujeta a tales factores como el tipo exacto de afección que se trata, la condición del paciente que se trata, así como los otros ingredientes en la composición. La invención también posibilita la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo. La cantidad para proporcionar se determinará fácilmente por un experto habitual en la materia basándose en terapia con FGF-21.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse de una manera convencional.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitan la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe uno de los muchos conjuntos de criterios potenciales para la selección de sitios de incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural en FGF-21.

La Figura 1 muestra la homología de secuencia entre FGF-21 (número de acceso de Proteína BC018404) y FGF-19 (número de acceso de Proteína BAA75500) como se determina usando Vector NTI (Invitrogen; Carlsbad, CA). Los aminoácidos marcados con un asterisco son similares entre las dos moléculas. Los aminoácidos que están subrayados son idénticos entre los dos polipéptidos. Se generaron siete polipéptidos de FGF-21 diferentes sustituyendo un aminoácido codificado de forma natural con un aminoácido no codificado de forma natural. Cada polipéptido tuvo uno de los aminoácidos marcados con un rectángulo en la Figura 1 sustituido con para-acetilfenilalanina. Los polipéptidos generados carecían de las secuencias líder mostradas en las Figuras 1 y 3 y se

marcaron con His en el extremo N terminal con 6 restos de histidina. SEC ID N° 1 es una secuencia de 181 aminoácidos de FGF-21 humano (forma P) sin la secuencia líder. SEC ID N° 2 es la secuencia de FGF-21 humano (forma P) sin la secuencia líder y con un marcador His en el extremo N terminal. Cada uno de los polipéptidos generados tuvo una sustitución de aminoácidos no codificados de forma natural en una de las siguientes posiciones

5 10, 52, 77, 117, 126, 131 y 162 de SEC ID N° 1.

La Figura 2 muestra la estructura de FGF-19 humano que se obtuvo del Banco de Datos de Proteínas (PDB) (Bernstein y col. J. Mol. Biol. 1997, 112, pp 535) (IPWA) y se marcó usando el software PyMOL (DeLano Scientific; Palo Alto, CA). Los aminoácidos correspondientes a V34, L79, G104, S144, K155, L160 y S196 de FGF-19 se sustituyeron con para-acetilfenilalanina en polipéptidos de FGF-21 de la invención. La línea discontinua indica regiones que no se resolvieron en la estructura original.

La Figura 3 muestra la homología de secuencia entre FGF-21 (número de acceso de Proteína BC018404) y FGF-2 (número de acceso de Proteína BAA75500) como se determinó usando Vector NTI (Invitrogen; Carlsbad, CA). Los aminoácidos marcados con un asterisco son similares entre las dos moléculas. Los aminoácidos que están subrayados son idénticos entre los dos polipéptidos. Los 7 aminoácidos mostrados en la Figura 1 como sitios para sustitución también se sitúan en un rectángulo en la Figura 3.

La Figura 4 muestra la estructura de FGF-2 humano que se obtuvo de PDB (ICVS) y se marcó usando el software PyMOL (DeLano Scientific; Palo Alto, CA). Las estructuras grises son receptor de FGF humano 1 (FGFR1) y las negras son FGF2 humano. Plotnikov, AN y col. Cell. 3 Sep 1999; 98(5): 641-50 describe la estructura cristalina de FGF2 unido al receptor de FGF. Los aminoácidos correspondientes a F21, K62, K86, V125, K134, T139 de FGF-2 se sustituyeron con para-acetilfenilalanina en polipéptidos de FGF-21 de la invención. La línea discontinua indica regiones que no se resolvieron en la estructura original.

Otro conjunto de criterios para la selección de sitios preferidos de incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural es el siguiente. Se usaron diez estructuras cristalinas del Banco de Datos de Proteínas para modelar la estructura de FGF-21: 1PWA (FGF-19 humano); 1IJT (FGF-4 humano); INUN (Complejo de FGF10 humano-Receptor de FGF 2b); 1G82 (dímero de FGF-9 humano con Receptor de FGF y heparina); 1IHK (FGF-9 humano); IBAR (FGF-1 bovino); 1QKQ (FGF-7 de rata); 1K5U (FGF-1 humano); 1FQ9 (FGF-2 humano con Receptor de FGF 1 y heparina); y 2FDB (FGF-8b humano con Receptor de FGF 2c). Las coordenadas para estas estructuras están disponibles del Banco de Datos de Proteínas (PDB) (Bernstein y col. J. Mol. Biol. 1997, 112, pp 535). Una comparación de las estructuras cristalinas indicó que eran muy similares en la estructura central. Sin embargo, se descubrió que los extremos N- y C- eran altamente divergentes entre estas moléculas de FGF y por lo tanto los extremos no pudieron modelarse. La modelización identificó dos restos, Y22 e Y104, que estaban altamente conservados y estaban implicados en la unión con el receptor. También se identificaron dos sitios de unión a heparina potenciales que implicaban R36 y E37. Las posiciones de aminoácidos identificadas para los restos de unión al receptor y unión a heparina corresponden a SEC ID N° 1.

35 Como resultado, se identificaron restos que 1) no interferirían con la unión con el receptor de FGF o heparina, 2) no estarían presentes en el interior de la proteína, y 3) estarían en regiones que eran bastante uniformes entre las estructuras cristalinas. Se incorpora un aminoácido no codificado de forma natural en las siguientes posiciones de FGF-21: 108 SEC ID N° 1 o los aminoácidos correspondientes en SEC ID N° 2-7).

Los siguientes criterios se usaron para evaluar cada posición de FGF-21 con respecto a la introducción de un aminoácido no codificado de forma natural: el resto (a) no debería interferir con la unión del receptor de FGF-21 basándose en el análisis estructural, (b) no debería verse afectado por mutagénesis de exploración homóloga o de alanina, (c) debería exponerse en superficie y mostrar interacciones de enlaces de hidrógeno de van der Waals mínimas con los restos circundantes, (d) debería suprimirse o ser variable en variantes de FGF-21, (e) daría como resultado cambios conservativos tras la sustitución con un aminoácido no codificado de forma natural y (f) podría hallarse en regiones altamente flexibles o regiones estructuralmente rígidas.

También pueden usarse estructuras cristalinas adicionales o diferentes para miembros de la familia de FGF tales como estructuras para FGF-23 y/o FGF-19 para seleccionar sitios para incorporación de uno o más aminoácidos no codificados de forma natural en FGF-21. Por ejemplo, la estructura cristalina de FGF-19 humano (PDB ID 2P23) y/o la estructura cristalina de FGF-19 humano (PDB ID 2P23) y/o FGF-23 humano (PDB ID 2P39) pueden proporcionar información adicional para seleccionar sitios para incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural en FGF-21. Tales sitios pueden estar en diferentes regiones de la proteína, incluyendo pero sin limitación, los extremos N- y C-, regiones de unión con el receptor y de unión con heparina. Además, pueden realizarse cálculos adicionales sobre la molécula de FGF-21 1, utilizando el programa Cx (Pintar y col. (2002) Bioinformatics, 18, pp 980) para evaluar el alcance de la protrusión para cada átomo de la proteína.

55 Se incorpora un aminoácido no codificado de forma natural en las siguientes posiciones en FGF-21: 108 (SEC ID N° 1 o los aminoácidos correspondientes en SEC ID N° 2-7).

Ejemplo 2

Este ejemplo detalla clonación y expresión de un polipéptido de FGF-21 que incluye un aminoácido no codificado de

forma natural en *E. coli*. Este ejemplo también describe un procedimiento para evaluar la actividad biológica de polipéptidos de FGF-21 modificados.

5 Se conocen procedimientos para clonar FGF-21 por los expertos habituales en la materia. Se detallan secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas para FGF-21 y clonación de FGF-21 en células huésped en la Patente de Estados Unidos N° 6.716.626; Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2005/0176631, 2005/0037457, 2004/0185494, 2004/0259780, 2002/0164713 y 2001/0012628; documentos WO 01/36640; WO 03/011213; WO 03/059270; WO 04/110472; WO 05/061712; WO 05/072769; WO 05/091944; WO 05/113606; WO 06/028595; WO 06/028714; WO 06/050247; WO 06/065582; WO 06/078463.

10 Se muestra ADNc que codifica la forma P de FGF-21 sin la secuencia líder como SEC ID N° 8. Este polipéptido se muestra como SEC ID N° 1.

Se muestra ADNc que codifica una forma P marcada con His de FGF-21 sin una secuencia líder como SEC ID N° 9. Este polipéptido se muestra como SEC ID N° 2.

Se muestra ADNc que codifica la forma P de FGF-21 con una secuencia líder que contiene 3 leucinas juntas como SEC ID N° 10. Este polipéptido se muestra como SEC ID N° 3.

15 Se muestra ADNc que codifica la forma P de FGF-21 con una secuencia líder que contiene 2 leucinas juntas como SEC ID N° 11. Este polipéptido se muestra como SEC ID N° 4.

Se muestra ADNc que codifica la forma L de FGF-21 sin la secuencia líder como SEC ID N° 12. Este polipéptido se muestra como SEC ID N° 5.

20 Se muestra ADNc que codifica la forma L de FGF-21 con una secuencia líder que contiene 3 leucinas juntas como SEC ID N° 13. Este polipéptido se muestra como SEC ID N° 6.

Se muestra ADNc que codifica la forma L de FGF-21 con una secuencia líder que contiene 2 leucinas juntas como SEC ID N° 14. Este polipéptido se muestra como SEC ID N° 7.

25 Se usa un sistema de traducción introducido que comprende un ARNt ortogonal (ARNt-O) y una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (RS-O) para expresar FGF-21 que contiene un aminoácido codificado de forma natural. La RS-O aminoacila preferentemente el ARNt-O con un aminoácido no codificado de forma natural. A su vez, el sistema de traducción inserta el aminoácido no codificado de forma natural en FGF-21, en respuesta a un codón selector codificado. Se describen secuencias de RS-O y ARNt-O adecuadas en el documento WO2006/068802 titulado "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof" (E9; SEC ID N° 15) y el documento WO 2007/021297 titulado "Compositions of tRNA and Uses Thereof" (F13; SEC ID N° 16)

30 Tabla 2: secuencias de RS-O y ARNt-O

SEC ID N° 17	ARNmt ^{Tyr/CUA} de <i>M. jannaschii</i>	ARNt
SEC ID N° 18	<i>HLAD03; un ARNt supresor ámbar optimizado</i>	ARNt
SEC ID N° 19	<i>HL325A; un ARNt supresor de desplazamiento de fase AGGA optimizado</i>	ARNt
SEC ID N° 20	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-L-fenilalanina p-Az-PheRS(6)</i>	RS
SEC ID N° 21	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina p-BpaRS(1)</i>	RS
SEC ID N° 22	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS</i>	RS
SEC ID N° 23	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS</i>	RS
SEC ID N° 24	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS</i>	RS
SEC ID N° 25	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az- PheRS(1)</i>	RS
SEC ID N° 26	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az- PheRS(3)</i>	RS

(continuación)

SEC ID N° 27	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az- PheRS(4)</i>	RS
SEC ID N° 28	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az- PheRS(2)</i>	RS
SEC ID N° 29	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW1)</i>	RS
SEC ID N° 30	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW5)</i>	RS
SEC ID N° 31	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW6)</i>	RS
SEC ID N° 32	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-5)</i>	RS
SEC ID N° 33	<i>Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-6)</i>	RS

5 La transformación de *E. coli* con plásmidos que contienen el gen de FGF-21 modificado y el par de aminoacil ARNt sintetasa/ARNt ortogonal (específico para el aminoácido no codificado de forma natural deseado) permite la incorporación específica de sitio de aminoácido no codificado de forma natural en el polipéptido de FGF-21.

Se amplificó FGF-21 maduro de tipo silvestre por PCR a partir de una reacción de síntesis de ADNc derivada de ARNm poliA+ de hígado humano sano (Biochain) usando protocolos convencionales y se clonó en pET30 (NcoI-BamHI). Después de confirmación de secuencia, se subclonó FGF-21 que incluía una secuencia N-terminal HHHHHHSGG en un vector de supresión que contenía un tirosil ARNt^{Tyr/CUA} supresor ámbar de *Methanococcus jannaschii* (ARNt^{Tyr/CUA} Mj) bajo el control constitutivo de un promotor sintético derivado de la secuencia promotora de lipoproteína de *E. coli* (Miller, J.H., Gene, 1986), así como la tirosil-ARNt-sintetasa ortogonal (MjTyrRS) bajo el control del promotor de GlnRS de *E. coli*. La expresión de FGF-21 estaba bajo el control del promotor de T7. Se introdujeron mutaciones ámbar usando protocolos de mutación de cambio rápido convencionales (Stratagene; La Jolla, California). Se verificó la secuencia de todas las construcciones.

15 Supresión con para-acetil-fenilalanina (pAcF)

Se transformaron plásmidos (pVK3-hisFGF21) en la cepa W3110 B2 de *E. coli* en la que la expresión de la T7 polimerasa estaba bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Se diluyeron cultivos bacterianos durante una noche 1:100 en matraces de agitación que contenían medio de cultivo 2X YT y se cultivaron a 37 °C a una DO₆₀₀ de ~0,8. Se indujo expresión proteica mediante la adición de arabinosa (0,2% final) y para-acetil-fenilalanina (pAcF) a una concentración final de 4 mM. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Las células se sedimentaron y se resuspendieron en tapón de lisis B-PER (Pierce) 100 ul/DO/ml + 10 µg/ml de DNasa y se incubaron a 37 °C durante 30 min. El material celular se retiró por centrifugación y el sobrenadante se retiró. El sedimento se resuspendió en una cantidad igual de tampón de carga de proteínas de SDS-PAGE. Todas las muestras se cargaron en un gel PAGE 4-12% con MES y DTT. Se conocen por los expertos habituales en la materia procedimientos para purificación de FGF-21 y se confirman por SDS-PAGE, Análisis de Transferencia de Western o espectrometría de masas de trampa iónica de ionización por electronebulización y similares.

Se muestra expresión de FGF-21 marcado con His N-terminal y supresión en 7 sitios ámbar en la Figura 5. El polipéptido de FGF-21 está marcado con una flecha. La Figura 5 muestra las muestras de sedimentos de B-PER- Carril 1: Marcador; Carril 2: preinducción con VK3-FGF21, sobrenadante; Carril 3: preinducción con VK3-FGF21, sedimento; Carril 4: VK3-FGF21 arabinosa 0,2%, sobrenadante; Carril 5: VK3-FGF21 arabinosa 0,2%, sedimento; Carril 6: VK3-FGF21- pAcF- L10, arabinosa 0,2%; Carril 7: VK3-FGF21-pAcF- L52, arabinosa 0,2%; Carril 8: VK3-FGF21- pAcF- R77, arabinosa 0,2%; Carril 9: VK3-FGF21- pAcF- H117, arabinosa 0,2%; Carril 10: VK3-FGF21-pAcF-R126, arabinosa 0,2%; Carril 11: VK3-FGF21-pAcF-R131, arabinosa 0,2%; Carril 12: VK3-FGF21-pAcF-S, 162, arabinosa 0,2%. Los números de posición indicados para la sustitución de aminoácidos se basan en SEC ID N°: 1.

La Figura 6 muestra las muestras de sobrenadante de B-PER - Carril 1: preinducción con VK3-FGF21, sobrenadante; Carril 2: preinducción con VK3-FGF21, sedimento; Carril 3: marcador, Carril 4: VK3-FGF21 arabinosa 0,2%, sobrenadante, Carril 5: VK3-FGF21 arabinosa 0,2%, sedimento; Carril 6: VK3-FGF21-pAcF-L10, arabinosa 0,2%; Carril 7: VK3-FGF21-pAcF-L52; arabinosa, 0,2%; Carril 8: VK3-FGF21-pAcF-R77, arabinosa 0,2%; Carril 9: VK3-FGF21-pAcF-H117, arabinosa 0,2%; Carril 10: VK3-FGF21-pAcF-R126, arabinosa 0,2%; Carril 11: VK3-FGF21-pAcF-R131, arabinosa 0,2%; Carril 12: VK3-FGF21-pAcF-S162, arabinosa 0,2%. Los números de posiciones indicados para la sustitución de aminoácidos se basan en SEC ID N°: 1.

Las proteínas de FGF-21 mutantes marcadas con His pueden purificarse usando procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia. La resina de quelación de níquel ProBond (Invitrogen, Carlsbad, CA) puede usarse mediante los procedimientos de purificación de proteínas marcadas con His convencionales proporcionados por el fabricante.

- 5 pVK10 (Figura 24) se desarrolló para su uso con la proteína de FGF-21 no marcada, que tiene una secuencia proporcionada en la Figura 25. Este fue el vector usado para realizar los mutantes R36am e Y83am y hay datos adicionales sobre estas proteínas mutantes de FGF-21 no marcadas con His y su purificación posteriormente en los ejemplos y se muestran en las figuras.

Diferenciación de 3T3-L1 a adipocitos y ensayo de captación de glucosa

- 10 Para evaluar la actividad biológica de polipéptidos de FGF-21, se puede realizar el siguiente ensayo. Se siembran fibroblastos 3T3-L1 de ratón (ATCC N° CL-173) en una placa de 10 cm con DMEM que contiene suero de ternero bovino al 10%. Las células se mantienen a una densidad no más alta del 70% para expansión. Antes de comenzar la diferenciación a adipocitos, se permite que las células lleguen al 100% de confluencia; el medio debe cambiarse cada 2 días. Las células se cuentan y se siembran a 25.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos (las células también pueden sembrarse en una placa de 96 pocillos Cytostar-T) y se incuban durante otras 48 horas. Se induce diferenciación añadiendo el siguiente medio después de retirar el medio de cultivo anterior: DMEM complementado con FBS 10% (suero de ternero fetal), dexametasona 1 µM (DBX), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM e insulina 5 µg/ml. Un modo alternativo para inducir diferenciación es tratar las células con rosiglitazona 1 µM e incubar durante 6 días antes de cambiar el medio a DMEM/FBS 10%, puesto que esta es una manera más rápida de inducir que los fibroblastos 3T3-L1 se diferencien a adipocitos. Una tercera posibilidad es combinar los dos procedimientos para acortar el tiempo para diferenciación.

- 25 Después de añadir medio que contiene DBX/IBMX/insulina a las células, las células se incuban durante 48 horas. El medio se cambia a DMEM/FBS 10%/insulina 5 µg/ml y las células se incuban durante 48 horas. A continuación el medio se cambia a DMEM/FBS 10% y el medio se reemplaza con medio nuevo cada 2 días. Las células se diferenciarán entre 7 y 14 días. Las células diferenciadas acumulan gotas de lípidos. Las células pueden teñirse con OIL RED O. Una vez que el 95% de los adipocitos contienen gotas de lípidos, las células pueden usarse para el ensayo de captura de glucosa.

- 30 Las 3T3-L1 diferenciadas se tratan con FGF-21 (1 µg/ml) en DMEM complementado con BSA sin ácidos grasos 0,1% durante 18 horas para privar de alimento a las células. Las células se lavan después 3 veces con tampón HEPES Krebs-Ringer (KRH = NaCl 0,118M, KCl 5 mM, CaCl₂ 2,54 mM, KH₂PO₄ 1,19 mM, MgSO₄ 1,19 mM y HEPES 20 mM) complementado con FAF-BSA 0,1%. La mezcla de marcaje se prepara añadiendo 4 µCi, 0,1 mM de 2-desoxiD-[1-³H]-glucosa a tampón de KRH/FAF-BSA 0,1%. Las células se añaden y se incuban durante 1 hora a 37 °C. La reacción se detiene lavando las células dos veces con PBS helado que contiene citocalasina B 20 µM. La placa se seca para eliminar cualquier tampón residual. Se añade líquido de centelleo a cada pocillo y las muestras se cuentan en un TopCounter.

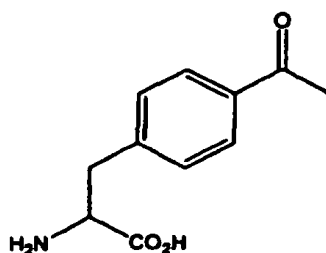
- 35 Un modo alternativo para medir la captación de glucosa es cargar las células 3T3-L1 diferenciadas con un sustrato no radiactivo como 2-NBDG y leer con un lector de placas de fluorescencia. Un procedimiento indirecto para medir la captación de glucosa es medir la expresión de GLUT1 o GLUT4 en la superficie de membrana celular. GLUT1 y GLUT4 son transportadores de glucosa que se translocan en la superficie de membrana celular desde las vesículas internas tras estimulación con insulina o FGF-21.

Puede desarrollarse un ELISA en células vivas.

Ejemplo 3

Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y posterior reacción con un PEG que contiene aminooxi.

- 45 Este ejemplo demuestra un procedimiento para la generación de un polipéptido de FGF-21 que incorpora un aminoácido no codificado de forma natural que contiene cetona que se hace reaccionar posteriormente con un PEG que contiene aminooxi de aproximadamente 5.000 de PM. Cada uno de los restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEC ID N°: 2-7) se sustituye de forma separada con un aminoácido no codificado de forma natural que tiene la siguiente estructura:



Las secuencias utilizadas para incorporación específica de sitio de *p*-acetil-fenilalanina en FGF-21 son SEC ID N°: 1 (FGF-21) y SEC ID N°: 16 ó 17 (ARNmutt, ARNtm^{Tyr^{CUA}} de *M. jannaschii*), y 15, 29, 30 ó 31 (TyrRS LW1, 5 ó 6) descritas en el Ejemplo 2 anterior.

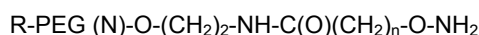
- 5 Una vez modificada, la variante del polipéptido de FGF-21 que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un derivado de PEG que contiene aminooxi de la forma: R-PEG (N)-O-(CH₂)_n-O-NH₂

En la que R es metilo, n es 3 y N es aproximadamente 5.000 PM. El FGF-21 purificado que contiene *p*-acetilfenilalanina disuelto a 10 mg/ml en MES 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 6,0, Hepes 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 7,0 o en acetato sódico 10 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de 10 a 100 veces de PEG que contiene aminooxi, y después se agita durante 10 - 16 horas a temperatura ambiente (Jencks, W. J Am.Chem.. Soc. 1959, 81, pp 475). El PEG-FGF-21 se diluye después en un tampón apropiado para purificación y análisis inmediato.

Ejemplo 4

Conjugación con un PEG que consiste en un grupo de hidroxilamina unido al PEG mediante un enlace de amida.

- 15 Se acopla un reactivo de PEG que tiene la siguiente estructura a un aminoácido no codificado de forma natural que contiene cetona usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3:



en la que R = metilo, n = 4 y N es aproximadamente 20.000 PM. Las condiciones de reacción, purificación y análisis son como se describe en el Ejemplo 3.

20 Ejemplo 5

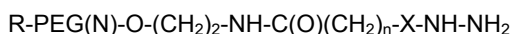
Este ejemplo detalla la introducción de dos aminoácidos no codificados de forma natural distintos en polipéptidos de FGF-21.

Este ejemplo demuestra un procedimiento para la generación de un polipéptido de FGF-21 que incorpora aminoácidos no codificados de forma natural que comprenden una funcionalidad de cetona en dos posiciones entre los siguientes restos: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEC ID N°: 2-7). El polipéptido de FGF-21 se prepara como se describe en los Ejemplos 1 y 2, excepto que se introduce el codón selector en dos sitios distintos dentro del ácido nucleico.

35 Ejemplo 6

Este ejemplo detalla la conjugación de polipéptido de FGF-21 con un PEG que contiene hidrazida y posterior reducción *in situ*.

- 40 Se prepara un polipéptido de FGF-21 que incorpora un aminoácido que contiene carbonilo de acuerdo con el procedimiento descrito en los Ejemplos 2 y 3. Una vez modificado, un PEG que contiene hidrazida que tiene la siguiente estructura se conjuga con el polipéptido FGF-21:



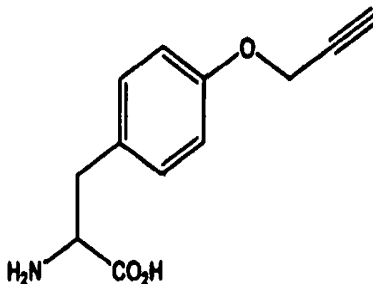
en la que R = metilo, n = 2 y N = 10.000 PM y X es un grupo carbonilo (C = O). El FGF-21 purificado que contiene *p*-acetil-fenilalanina se disuelve a entre 0,1 y 10 mg/ml en MES 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 6,0, Hepes 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 7,0 o en acetato sódico 10 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO),

pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de 1 a 100 veces de PEG que contiene hidrazida, y la hidrazona correspondiente se reduce *in situ* mediante la adición de NaCNBH₃ 1 M de reserva (Sigma Chemical, St. Louis, MO), disuelto en H₂O, a una concentración final de 10-50 mM. Se llevan a cabo reacciones en oscuridad de 4 °C a TA durante 18-24 horas. Las reacciones se detienen mediante adición de Tris 1 M (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a aproximadamente pH 7,6 a una concentración de Tris final de 50 mM o se diluyen en tampón apropiado para purificación inmediata.

Ejemplo 7

Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene alquino en un polipéptido FGF-21 y derivatización con mPEG-azida.

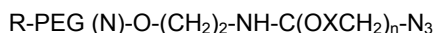
Los siguientes restos, antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEC ID N°: 2-7), se sustituyen cada uno con el siguiente aminoácido no codificado de forma natural:



Las secuencias utilizadas para incorporación específica de sitio de p-propargil-tirosina en FGF-21 son SEC ID N°: 1 (FGF-21), SEC ID N°: 16 ó 17 (ARNtm_{Tyr^{CUA}} de *M. jannaschii*) y 22, 23 ó 24 descritos en el Ejemplo 2 anterior. El polipéptido FGF-21 que contiene la propargil tirosina se expresa en *E. coli* y se purifica usando las condiciones descritas en el Ejemplo 3.

El FGF-21 purificado que contiene propargil-tirosina disuelto a entre 0,1 y 10 mg/ml en tampón PB (fosfato sódico 100 mM, NaCl 0,15 M, pH = 8) y un exceso de 10 a 1000 veces de un PEG que contiene azida se añade a la mezcla de reacción. Se añade después una cantidad catalítica de CuSO₄ y alambre de Cu a la mezcla de reacción. Después la mezcla se incuba (incluyendo pero sin limitación, aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente o 37 °C, o durante una noche a 4 °C), se añade H₂O y la mezcla se filtra a través de una membrana de diálisis. La muestra puede analizarse con respecto a la adición, incluyendo pero sin limitación, por procedimientos similares descritos en el Ejemplo 3.

En este Ejemplo, el PEG tendrá la siguiente estructura:



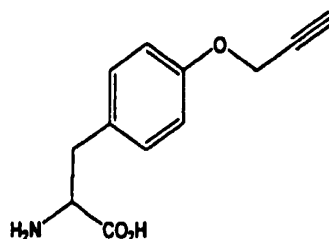
En la que R es metilo, n es 4 y N es 10.000 PM.

Ejemplo 8

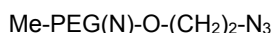
Este ejemplo detalla la sustitución de un aminoácido grande hidrófobo en un polipéptido de FGF-21 con propargil tirosina.

Un resto de Phe, Trp o Tyr presente dentro de una de las siguientes regiones de FGF-21: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en

SEC ID N°: 2-7) se sustituye con el siguiente aminoácido no codificado de forma natural como se describe en el Ejemplo 7:



Una vez modificado, se une un PEG a la variante del polipéptido de FGF-21 que comprende el aminoácido que contiene alquino. El PEG tendrá la siguiente estructura:



y procedimientos de acoplamiento seguirán a los del Ejemplo 7. Esto generará una variante de polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que es aproximadamente isostérico con uno de los aminoácidos hidrófobos grandes de origen natural y que se modifica con un derivado de PEG en un sitio distinto dentro del polipéptido.

Ejemplo 9

Este ejemplo detalla la generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero de polipéptidos de FGF-21 separados por uno o más engarces de PEG.

La variante de polipéptido de FGF-21 que contiene alquino producida en el Ejemplo 7 se hace reaccionar con un derivado de PEG de la forma:

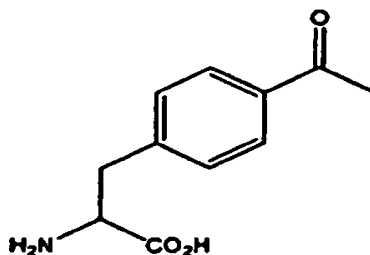


en la que n es 4 y el PEG tiene un PM medio de aproximadamente 5.000, para generar el homodímero de polipéptido de FGF-21 correspondiente en el que las dos moléculas de FGF-21 se separan físicamente por PEG. De una manera análoga puede acoplarse un polipéptido de FGF-21 con uno o más polipéptidos distintos para formar heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros. Se realizarán acoplamiento, purificación y análisis como en los Ejemplos 7 y 3.

Ejemplo 10

Este ejemplo detalla el acoplamiento de un resto de sacárido con un polipéptido de FGF-21.

Un resto de los siguientes se sustituye con el aminoácido no codificado de forma natural posterior: antes de la posición 1 (es decir en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEC ID N°: 2-7) como se describe en el Ejemplo 3.



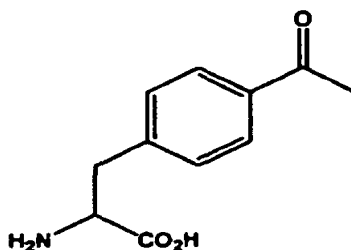
Una vez modificada, la variante del polipéptido de FGF-21 que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un análogo de aminooxi ligado a β de N-acetilglucosamina (GlcNAc). La variante del polipéptido de FGF-21 (10 mg/ml) y el aminooxi sacárido (21 mM) se mezclan en tampón de acetato sódico 100 mM acuoso (pH 5,5) y se incuban a 37 °C durante 7 a 26 horas. Un segundo sacárido se acopla con el primero

enzimáticamente incubando el polipéptido de FGF-21 conjugado con sacárido (5 mg/ml) con UDP-galactosa (16 mM) y β -1,4-galactosiltransferasa (0,4 unidades/ml) en tampón HEPES 150 mM (pH 7,4) durante 48 horas a temperatura ambiente (Schanbacher y col. J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061).

Ejemplo 11

- 5 Este ejemplo detalla la generación de un antagonista del polipéptido de FGF-21 pegilado.

Un resto, incluyendo pero sin limitación los implicados en unión con el receptor de FGF-21, se sustituye con el siguiente aminoácido no codificado de forma natural como se describe en el Ejemplo 3.



- 10 Una vez modificada, la variante del polipéptido de FGF-21 que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hará reaccionar con un derivado de PEG que contiene aminooxi de la forma: R-PEG(N)-O-(CH₂)_n-O-NH₂

en la que R es metilo, n es 4 y N es 20.000 PM para generar un antagonista del polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que se modifica con un derivado de PEG en un sitio sencillo dentro del polipéptido. El acoplamiento, purificación y análisis se realizan como en el Ejemplo 3.

Ejemplo 12

- 15 Generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero de polipéptido de FGF-21 en el que las moléculas de FGF-21 se unen directamente.

- Una variante del polipéptido de FGF-21 que comprende el aminoácido que contiene alquino puede acoplarse directamente a otra variante del polipéptido de FGF-21 que comprende el aminoácido que contiene azido. De una manera análoga puede acoplarse un polipéptido de FGF-21 con uno o más polipéptidos distintos para formar heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros. Se realizan acoplamiento, purificación y análisis como en los Ejemplos 3, 6 y 7.
- 20

Ejemplo 13

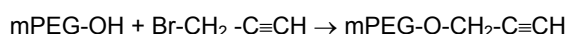


A

B

- 25 El polialquilenglicol (P-OH) se hace reaccionar con el haluro de alquilo (A) para formar el éter (B). En estos compuestos, n es un número entero de uno a nueve y R' puede ser un grupo alquilo o heteroalquilo C1 a C20 de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado. R' También puede ser un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico saturado o insaturado C3 a C7, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir, o un grupo alkarilo sustituido o sin sustituir (el alquilo es un alquilo C1 a C20 saturado o insaturado) o heteroalkarilo. Típicamente, el PEG-OH es polietilenglicol (PEG) o monometoxi polietilenglicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 800 a 40.000 Daltons (Da).
- 30

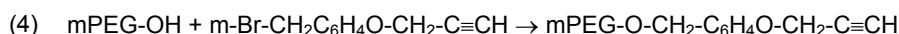
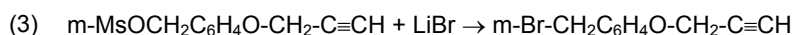
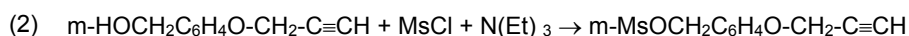
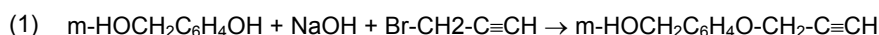
Ejemplo 14



- 35 mPEG-OH con un peso molecular de 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) se trató con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml). Una solución de bromuro de propargilo, se disolvió como una solución al 80% en peso en xileno (0,56 ml, 5 mmol, 50 equiv., Aldrich), y después a la solución se le añadió una cantidad catalítica de KI y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 horas. Después se añadió agua (1 ml) y el disolvente se retiró al vacío. Al residuo se le añadió CH₂Cl₂ (25 ml) y la capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo para dar aproximadamente 2 ml. Esta solución de CH₂Cl₂ se añadió gota a gota a éter dietílico (150 ml). El precipitado resultante se recogió, se lavó con varias porciones de éter dietílico frío y se secó,
- 40 proporcionando propargil-O-PEG.

Ejemplo 15

El mPEG-OH con un peso molecular de 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) se trató con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml). Después, a la mezcla se le añadieron cincuenta equivalentes de 5-bromo-1-pentina (0,53 ml, 5 mmol, Aldrich) y una cantidad catalítica de KI. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 16 horas. Después, se añadió agua (1 ml) y el disolvente se retiró al vacío. Al residuo se le añadió CH_2Cl_2 (25 ml) y la capa orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 ml. Esta solución de CH_2Cl_2 se añadió gota a gota a éter dietílico (150 ml). El precipitado resultante se recogió, se lavó con varias porciones de éter dietílico frío y se secó, proporcionando el alquino correspondiente. Puede usarse 5-cloro-1-pentina en una reacción similar.

Ejemplo 16

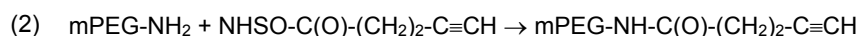
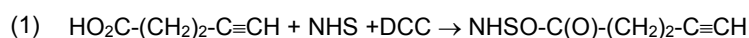
A una solución de 3-hidroxibencilalcohol (2,4 g, 20 mmol) en THF (50 ml) y agua (2,5 ml) se le añadió en primer lugar hidróxido sódico en polvo (1,5 g, 37,5 mmol) y después una solución de bromuro de propargilo, disuelta en forma de una solución al 80% en xileno (3,36 ml, 30 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 6 horas. A la mezcla se le añadió ácido cítrico al 10% (2,5 ml) y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 ml), se secó sobre MgSO_4 y se concentró, dando el 3-propargiloxibencil alcohol.

Se añadieron cloruro de metanosulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 ml, 20 mmol) a una solución del compuesto 3 (2,0 g, 11,0 mmol) en CH_2Cl_2 a 0 °C y la reacción se puso en el frigorífico durante 16 horas. Un tratamiento habitual proporcionó el mesilato en forma de un aceite de color amarillo pálido. Este aceite (2,4 g, 9,2 mmol) se disolvió en THF (20 ml) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 hora y después se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió agua (2,5 ml) y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron para dar el bromuro deseado.

Se disolvió mPEG-OH 20 kDa (1,0 g, 0,05 mmol, Sunbio) en THF (20 ml) y la solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió NaH (6 mg, 0,25 mmol) con agitación vigorosa durante un periodo de varios minutos seguido de la adición del bromuro obtenido anteriormente (2,55 g, 11,4 mmol) y una cantidad catalítica de KI. El baño de refrigeración se retiró y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 12 horas. A la mezcla se le añadió agua (1,0 ml) y el disolvente se retiró al vacío. Al residuo se le añadió CH_2Cl_2 (25 ml) y la capa orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 ml. La adición gota a gota a una solución de éter (150 ml) dio como resultado un precipitado de color blanco, que se recogió para producir el derivado de PEG.

Ejemplo 17

Los polímeros de poli(etilenglicol) que contienen alquino terminal también pueden obtenerse mediante el acoplamiento de un polímero de poli(etilenglicol) que contiene un grupo funcional terminal a una molécula reactiva que contiene la funcionalidad alquino como se ha mostrado anteriormente. n está entre 1 y 10. R' puede ser H o un grupo alquilo pequeño de C1 a C4.

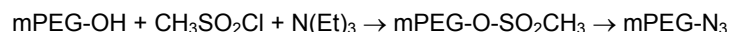
Ejemplo 18

Se disolvió ácido 4-pentinoico (2,943 g, 3,0 mmol) en CH_2Cl_2 (25 ml). Se añadieron N-hidroxisuccinimida (3,80 g, 3,3 mmol) y DCC (4,66 g, 3,0 mmol) y la solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El NHS éster en bruto resultante 7 se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Se disolvió mPEG-NH₂ con un peso molecular de 5.000 Da (mPEG-NH₂, 1 g, Sunbio) en THF (50 ml) y la mezcla se enfrió a 4 °C. Se añadió en porciones el NHS éster 7 (400 mg, 0,4 mmol) con agitación vigorosa. La mezcla se dejó en agitación durante 3 horas mientras se calentaba a temperatura ambiente. Después, se añadió agua (2 ml) y el disolvente se retiró al vacío. Al residuo se le añadió CH₂Cl₂ (50 ml) y la capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 ml. Esta solución de CH₂Cl₂ se añadió en porciones a éter (150 ml). El precipitado resultante se recogió y se secó al vacío.

Ejemplo 19

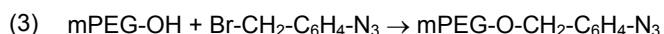
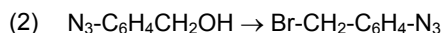
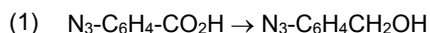
Este Ejemplo representa la preparación del metano sulfonil éster de poli(etilenglicol), que también puede denominarse como el metanosulfonato o mesilato de poli(etilenglicol). El tosilato correspondiente y los haluros pueden prepararse mediante procedimientos similares.



El mPEG-OH (PM = 3.400, 25 g, 10 mmol) en 150 ml de tolueno se destiló azeotrópicamente durante 2 horas en una atmósfera de nitrógeno y la solución se enfrió a temperatura ambiente. A la solución se le añadieron 40 ml de CH₂Cl₂ seco y 2,1 ml de trietilamina seca (15 mmol). La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadieron gota a gota 1,2 ml de cloruro de metanosulfonilo destilado (15 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante una noche, y la reacción se interrumpió añadiendo 2 ml de etanol absoluto. La mezcla se evaporó al vacío para retirar los disolventes, principalmente aquellos distintos de tolueno, se filtró, se concentró de nuevo al vacío y después se precipitó en 100 ml de éter dietílico. El filtrado se lavó con varias porciones de éter dietílico frío y se secó al vacío, proporcionando el mesilato.

El mesilato (20 g, 8 mmol) se disolvió en 75 ml de THF y la solución se enfrió a 4 °C. A la solución enfriada se le añadió azida sódica (1,56 g, 24 mmol). La reacción se calentó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. Después, los disolventes se evaporaron y el residuo se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml). La fracción orgánica se lavó con una solución de NaCl y se secó sobre MgSO₄ anhidro. El volumen se redujo hasta 20 ml y el producto se precipitó mediante la adición a 150 ml de éter seco frío.

Ejemplo 20



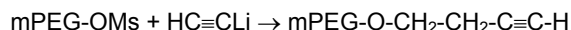
El 4-azidobencil alcohol puede producirse usando el procedimiento descrito en la Patente de Estados Unidos 5.998.595. Se añadieron cloruro de metanosulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 ml, 20 mmol) a una solución de 4-azidobencil alcohol (1,75 g, 11,0 mmol) en CH₂Cl₂ a 0 °C y la reacción se puso en el frigorífico durante 16 horas. Un tratamiento habitual proporcionó el mesilato en forma de un aceite de color amarillo pálido. Este aceite (9,2 mmol) se disolvió en THF (20 ml) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 hora y después se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió agua (2,5 ml) y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron, dando el bromuro deseado.

Se trató mPEG-OH 20 kDa (2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml) y a la mezcla se le añadió el bromuro (3,32 g, 15 mmol) junto con una cantidad catalítica de KI. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 12 horas. A la mezcla se le añadió agua (1,0 ml) y el disolvente se retiró al vacío. Al residuo se le añadió CH₂Cl₂ (25 ml) y la capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y el volumen se redujo hasta aproximadamente 2 ml. La adición gota a gota a una solución de éter (150 ml) dio como resultado un precipitado que se recogió, produciendo mPEG-O-CH₂-C₆H₄-N₃.

Ejemplo 21



Se disolvió NH₂-PEG-O-CH₂CH₂CO₂H (PM 3.400 Da, 2,0 g) en una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (10 ml) y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió propionato de 3-azido-1-N-hidroxisuccinimido (5 equiv.) con agitación vigorosa. Después de 3 horas, se añadieron 20 ml de H₂O y la mezcla se agitó durante 45 minutos más a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 3 con H₂SO₄ 0,5 N y se añadió NaCl a una concentración de aproximadamente el 15% en peso. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (100 ml x 3), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Después de la precipitación con éter dietílico frío, el producto se recogió por filtración y se secó al vacío, produciendo el derivado de PEG omega-carboxiazida.

Ejemplo 22

A una solución de acetiluro de litio (4 equiv.), preparado como se conoce en la técnica y enfriado a -78 °C en THF, se le añadió gota a gota una solución de mPEG-OM disuelta en THF con agitación vigorosa. Después de 3 horas, se dejó que la reacción se calentara a temperatura ambiente y se interrumpió con la adición de 1 ml de butanol. Después, se añadieron 20 ml de H₂O y la mezcla se agitó durante 45 minutos más a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 3 con H₂SO₄ 0,5 N y se añadió NaCl a una concentración de aproximadamente el 15% en peso. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (100 ml x 3), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Después de la precipitación con éter dietílico frío, el producto se recogió por filtración y se secó al vacío, produciendo el 1-(but-3-iniloxi)-metoxipolietilenglicol (mPEG).

Ejemplo 23

Pueden incorporarse aminoácidos que contienen azido y acetileno seleccionando los sitios en proteínas usando los procedimientos descritos en L. Wang, y col., (2001), Science 292:498-500, J.W. Chin y col., Science 301:964-7 (2003), J. W. Chin y col., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), Chem Bio Chem 3(11):1135-1137; J. W. Chin, y col., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024; y L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1:1-11. Una vez que se han incorporado los aminoácidos, se lleva a cabo la reacción de cicloadición con proteína 0,01 mM en tampón fosfato (PB), pH 8, en presencia de derivado de PEG 2 mM, CuSO₄ 1 mM, y ~ 1 mg de alambre de Cu durante 4 horas a 37 °C.

Ejemplo 24

Este ejemplo describe la síntesis de derivados de p-Acetil-D,L-fenilalanina (pAF) y m-PEG-hidroxilamina.

La pAF racémica se sintetiza usando el procedimiento que se ha descrito previamente en Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P. G., Biochemistry, (2003) 42, 6735-6746.

Para sintetizar el derivado de m-PEG-hidroxilamina, se completan los siguientes procedimientos. A una solución de ácido (N-t-Boc-aminooxi)acético (0,382 g, 2,0 mmol) y 1,3-diisopropilcarbodiimida (0,16 ml, 1,0 mmol) en diclorometano (DCM, 70 ml), que se agita a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora se le añaden metoxipolietilenglicol amina (m-PEG-NH₂, 7,5 g, 0,25 mmol, Mt. 30 K, de BioVectra) y diisopropiletilamina (0,1 ml, 0,5 mmol). La reacción se agita a TA durante 48 horas y después se concentra a aproximadamente 100 ml. La mezcla se añade gota a gota a éter frío (800 ml). El producto t-Boc-prottegido se retira por precipitación y se recoge por filtración y se lava con éter 3 x 100 ml. Se purifica adicionalmente mediante la disolución de nuevo en DCM (100 ml) y la precipitación dos veces en éter (800 ml). El producto se seca con un rendimiento al vacío de 7,2 g (96%), confirmado por RMN y prueba de Nihidrina.

El deBoc del producto protegido (7,0 g) que se ha obtenido anteriormente se realiza en TFA al 50%/DCM (40 ml) a 0 °C durante 1 hora y después a TA durante 1,5 hora. Después de eliminar la mayor parte del TFA al vacío, la sal TFA del derivado de hidroxilamina se convierte en la sal HCl añadiendo HCl 4 N en dioxano (1 ml) al residuo. El precipitado se disuelve en DCM (50 ml) y se precipita de nuevo en éter (800 ml). El producto final (6,8 g, 97%) se recoge por filtración, se lava con éter 3 x 100 ml, se seca al vacío y se almacena en una atmósfera de nitrógeno. Otros derivados de PEG (5 K, 20 K) hidroxilamina se sintetizan usando el mismo procedimiento.

Ejemplo 25Análisis de fosforilación de ERK1/2 inducida por FGF-21 WT y análogos de PEG 30K:

Sembrar 293 transfectadas de forma estable con Klotho humano beta a 100.000 células/pocillo (DMEM + FBS 10%) en una placa revestida con poli-Lys. Al día siguiente las células son 100% confluyentes, el medio se retira por aspiración y se reemplaza con medio nuevo y se incuba durante una noche. Después de 24 horas las células se estimulan con los análogos de FGF-21 de PEG 30K apropiados usando como patrón FGF21WT. Cada compuesto individual se prepara diluyéndolo en PBS/BSA 1%. Las células se tratan por triplicado durante 10 minutos a 37 °C en el incubador. Después de 10 minutos el medio de incubación se retira por aspiración cuidadosamente de cada pocillo y se añaden 40 µl de tampón de lisis de señalización celular 1x frío que contiene inhibidores de proteasa/ fosfatasa (cóctel PI, Na3VN4 y PMSF) a cada pocillo para producir lisados celulares. Se sitúa una placa de 96 pocillos en hielo durante 20 minutos y después se sedimenta por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos.

Los lisados celulares se congelan a -80 °C. Más tarde cada muestra se descongela y se añaden 10 µl de lisados celulares a placa tratada con MSD revestida con anticuerpo que captura las formas tanto no fosforiladas como fosforiladas de ERK1/2. Se produce incubación con anticuerpo primario durante 2 horas, después la placa se lava varias veces con tampón específico seguido de adición de anticuerpo secundario. Después de una hora de incubación la placa se lava de nuevo varias veces. Se añade tampón para lectura a cada pocillo. La placa se transfiere a una máquina de lectura de MSD. La curva que se produce se basa en las unidades de lectura anti ERK1/2 fosforilado y se calcula la CE50 usando Sigma Plot. La pérdida de actividad en veces se calcula dividiendo

CE50 del compuesto específico pegilado 30 K con la CE50 del WT.

Ejemplo 26: Protocolo de ensayo de fosforilación de ERK 1/2 celular (pERK) y análisis de MSD

5 Se mantuvieron células 293 β Klotho-4 en DMEM + FBS 10% + P/S + geneticina 0,5 mg/ml. Cuando las células alcanzaron 50-90% de confluencia, se tripsinizaron, y se sembraron 100.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos revestidas con poli-D-lys en DMEM + FBS 10% + P/S.

10 Al día siguiente cuando las células eran 100% confluyentes, se comprobaron para asegurar que el medio aún era rojo. Después el medio se retiró por aspirado. Se pipetearon 200 μ l/pocillo de diluciones seriadas de variantes de FGF-21 (en PBS + BSA 1 %) en la placa de 96 pocillos. La placa de 96 pocillos se situó después en un incubador de CO₂ 5% a 37 °C durante exactamente 9 minutos. Los tratamientos con FGF-21 se retiraron después
15 completamente por aspiración y se añadieron 40 μ l/pocillo de tampón de lisis de señalización celular 1x + cóctel de inhibidor de proteasa Sigma 1 x + ortovanadato sódico 2 mM + PMSF 1 mM + inhibidor de MSD fosfatasa I 1x + inhibidor de MSD fosfatasa II 1x + cóctel de inhibidor de MSD proteasa 1x + MSD PMSF 2 mM recién preparado. La placa se situó en hielo y se separó durante 25 minutos, mientras se pipeteó cada pocillo arriba y abajo con un pipeteador P20 para mezclar los lisados. Después de mezclar los pocillos, se situó el cubo de hielo completo y la placa en un agitador a 4 °C durante el resto del tiempo. Después de 25 minutos, la placa se sedimentó por centrifugación a 4000 rpm, 10 minutos a 4 °C. Se transfirieron los sobrenadantes a una placa de 96 pocillos de fondo redondo fría en hielo.

Análisis de MSD

20 Este ensayo se realizó usando el ensayo de fosfo (T/Y 202/204; 185/187)/ERK1/2 total del kit de lisado de células completas del sistema de ensayo MULTI-SPOT Meso Scala Discovery.

25 Todos los reactivos de MSD se descongelaron a temperatura ambiente y todos los tampones necesarios se prepararon según las instrucciones del kit. Para cada pocillo, se añadieron 150 μ l de bloqueador A a una placa doble de fosfo ERK-ERK total y se permitió que se bloqueara durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. La placa se lavó después 4x con 160 μ l/pocillo de tampón de lavado 1x. Se añadieron 16 μ l/pocillo de
30 tampón de lisis + inhibidores de proteasa y fosfatasa (preparados anteriormente para las estimulaciones celulares) y se transfirieron 10 μ l/pocillo de la placa de sobrenadante de lisado fría a los pocillos de la placa de MSD (el volumen total se convirtió después en 26 μ l/pocillo). La placa de MSD se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente en un agitador. La placa se lavó después 4x con 160 μ l/pocillo de tampón de lavado 1x. Se añadieron 25 μ l/pocillo de anticuerpo de detección (diluido 50x en tampón de dilución de anticuerpos) y se preparó para incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. La placa se lavó de nuevo 4x con 160 μ l/pocillo de tampón de lavado 1x y se añadieron 150 μ l/pocillo de tampón de lectura T 1x después de lo cual la placa se leyó inmediatamente en una máquina generadora de imágenes sector 2400 de MSD.

Cuantificación de BCA

35 Se usó el kit de ensayo de proteína BCA de Pierce. Se diluyó un patrón de BSA en una placa de 96 pocillos desde una concentración superior de 2 mg/ml, con diluciones 2x por las columnas en tampón de lisis de señalización celular 1x. (El último conjunto de pocillos fueron de tampón, sin BSA). Se pipetearon 25 μ l/pocillo de los patrones de BSA por duplicado en dos placas de 96 pocillos MaxiSorp. Se prepararon diluciones de lisados 3x en tampón de lisis de señalización celular 1x y se añadieron 25 μ l/pocillo a las placas MaxiSorp. Se preparó el reactivo de trabajo según la hoja de instrucciones del kit de Pierce. Se pipetearon 200 μ l en cada pocillo de las placas MaxiSorp. Las
40 placas se incubaron a temperatura ambiente y se leyeron a $\lambda = 562$ nm en el lector de placas.

Análisis de Datos

45 Se calcularon las concentraciones para todos los lisados con el kit de BCA. Cuando los lisados son todos similares en concentración, entonces no se normaliza con respecto al análisis MSD. Para el análisis de MSD, media de puntos repetidos, se calcula la desviación típica y los valores de CV. Se usa SigmaPlot para calcular los valores de CE50 para diluciones seriadas de variantes de FGF-21 y se usan las veces por encima de CE50 WT como el criterio de clasificación para las variantes. Los resultados pueden verse en la Figura 7a y 7b de la presente solicitud.

Ejemplo 27: Procedimiento corriente abajo no marcado de FGF-21

Solubilización de preparación de cuerpos de inclusión

50 Se resuspendió la pasta celular mezclando en un sólido 10% final en tampón de cuerpos de inclusión (IB) I a 4 °C (Tris 50 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM, Triton X-100 1%; 4 °C). Las células se lisaron pasando material resuspendido a través de un micro fluidificador un total de dos veces, después se centrifugó (10.000 g; 15 minutos; 4 °C) y el sobrenadante se decantó. El sedimento de IB se lavó por resuspensión en un volumen adicional de tampón IB I (Tris 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM, Triton X-100 1%; 4 °C) y se pasó el material resuspendido a través de un micro fluidificador un total de dos veces, después se centrifugó (10.000 g; 15 minutos; 4 °C) y el sobrenadante se decantó. El sedimento de IB se resuspendió en un volumen de tampón II (Tris 50 mM pH
55 4 °C) y el sobrenadante se decantó.

8,0; NaCl 100 mM, EDTA 1 mM; 4 °C), después se centrifugó (10.000 g; 15 minutos; 4 °C) y el sobrenadante se decantó. El sedimento de IB se resuspendió después en medio volumen de tampón II (Tris 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 4 °C). IB se separó en alícuotas en recipientes apropiados, después se centrifugó (10.000 g; 15 min; 4 °C) y el sobrenadante se decantó. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron (este es el punto en el que podrían almacenarse de otro modo a -80 °C hasta su uso posterior)

Solubilización de cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión se solubilizaron a una concentración final entre 10 y 15 mg/ml en tampón de solubilización (Tris 20 mM, pH 8,0; urea 8 M; β-ME 10 mM) e IB solubilizados incubados a temperatura ambiente con mezcla constante durante 1 hora. El material insoluble se retiró por filtración (filtro de PES de 0,45 μm) y la concentración proteica se ajustó (no siempre necesario) por dilución con tampón de solubilización adicional (cuando la concentración proteica es alta).

Replegamiento

Replegamiento por dilución a una concentración proteica final de 0,5 mg/ml en Tris 20 mM, pH 8,0; 4 °C. Se permitió que volvieran a plegarse durante 18 a 24 horas a 4 °C.

15 Purificación

Filtrado de la reacción de replegamiento a través de un filtro de PES de 0,45 μm. El material cargado sobre una columna de Q HP (GE Healthcare) se equilibró en tampón A. (Tris 20 mM, pH 7,5). Se eluyó FGF-21 con un gradiente lineal sobre 20 VC a tampón B 100% (Tris 20 mM, pH 7,5; NaCl 250 mM). Se agruparon los FGF-21 monoméricos.

20 Pegilación y purificación

Se tomó el grupo de Q HP y se intercambió el tampón a Tris 20 mM, pH 8,0; urea 2 M; EDTA 1 mM. El pH se redujo a 4,0 con ácido acético glacial 50%. Se concentró la muestra hasta $4,0 \pm 1,0$ mg/ml. Se añadió un exceso molar de PEG 12:1 y una concentración final de hidrazida acética 1%, pH 4,0 a la muestra. Se incubó a 28 °C durante 48-72 horas. Se añadió una base de Tris a una concentración final 50 mM a reacción de PEG y se diluyó 10 veces con agua RO. Se aseguró que la conductividad era < 1 ms/cm y el pH estaba entre 8,0-9,0. Se cargó material sobre una columna 30Q Source (GE Healthcare) equilibrada en Tampón A. (Tris 20 mM, pH 8,0). Se eluyó PEG-FGF-21 con un gradiente lineal sobre 20 VC a 100% B (Tris 20 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM). Se agrupó PEG-FGF-21 y se intercambió el tampón a Tris 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM. Se concentró material de PEG entre 1 y 2 mg/ml y se esterilizó por filtrado usando filtro de PES de 0,22 μm. Se almacenó a 4 °C. Para almacenamiento prolongado, se congeló rápidamente y se almacenó a -80 °C.

Ejemplo 28

Propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 en ratas

Este protocolo se usó para proporcionar datos (hallados en las Figuras 11-23) sobre las propiedades farmacocinéticas de compuestos de FGF-21 nativos y modificados con PEG producidos por tecnología patentada de Ambrx en ratas con catéteres. La farmacocinética de los artículos de ensayo se ensayó por ELISA específica para FGF-21 humano a partir de muestras de suero obtenidas en puntos temporales específicos después de dosificación farmacológica.

Artículos de ensayo:

1. El compuesto de Ambrx PEG-R77 FGF-21 se usará a 0,25 mg/ml diluido en PBS 1X.
2. El compuesto de Ambrx PEG-Y104 FGF-21 se usará a 0,25 mg/ml diluido en PBS 1X.
3. El compuesto de Ambrx PEG-R126 FGF-21 se usará a 0,25 mg/ml diluido en PBS 1X.

Formulación/calidad del artículo de ensayo:

Concentraciones de reserva =

PEG-R77 FGF-21 1,0 mg/ml

45 PEG-Y104 FGF-21 1,16 mg/ml

PEG-R126 FGF-21 1,08 mg/ml

Animales:

Se colocarán quirúrgicamente catéteres en la vena yugular a doce (12) ratas macho Sprague-Dawley (SD) que

ES 2 385 114 T3

pesan aproximadamente 250-275 gramos al inicio del estudio antes de llegar a Ambrx. Los animales se recibieron de CRL en buenas condiciones y se les aclimatará a la localización del estudio durante al menos 3 días antes del inicio del estudio. Las ratas se pesarán el día de la administración del artículo de ensayo. Los animales se alojarán en condiciones sin patógenos convencionales con agua y comida a voluntad.

5 Grupos de animales: *Todos los compuestos se administrarán por vía subcutánea*

Grupo 1 (n = 4): inyección SC de PEG-R77 (0,25 mg/kg).

Grupo 2 (n = 4): inyección SC de PEG-Y104 (0,25 mg/kg).

Grupo 3 (n = 4): inyección SC de PEG-R126 (0,25 mg/kg).

10 Los animales se pesan antes de la administración del artículo de ensayo. Los compuestos se formulan para administrarse a 1X PC en μ l. Se inyecta una administración subcutánea del artículo de ensayo en la región escapular dorsal. Los animales recibirán una inyección sencilla de artículo de ensayo (tiempo = 0). En puntos temporales específicos (véase posteriormente), se extraerá sangre completa de los animales, se recogerá en tubos de recogida microtainer SST. Se permitirá que el suero coagule durante 30 minutos antes de la centrifugación. El suero se transferirá a tubos de titulación de polipropileno, sellados con microtiras, y se almacenará a -800 °C hasta
15 que se analice por ELISA para determinar las concentraciones en suero de FGF-21.

Recogida de datos/Criterios de valoración:

Cada animal se usará durante un ciclo temporal de PK completo. Se extraerán aproximadamente 0,25 ml de sangre completa de los catéteres de las venas yugulares. Inmediatamente después de la recogida de sangre, los catéteres se lavarán abundantemente con 0,1 ml de solución salina.

20 Se requieren los siguientes puntos temporales de recogida para animales que reciben material del artículo de ensayo basándose en el perfil farmacocinético anticipado de los artículos de ensayo:

Presangrado, 1, 2, 4, 8, 24, 32 48, 56, 72 y 96 horas después de la dosis.

Terminación:

Todos los animales se sacrificarán después de la compleción del estudio

25 Resultados:

Los resultados se muestran en la tabla posterior y en las figuras que acompañan a la presente solicitud.

Propiedades de PK de isómero de PEG de FGF21-IV

Isómero de PEG 30K	Intravenoso 0,25 mg/kg								
		R72	R77	H87	E91	Y104	E110	R126	P146
Lambda_z	1/h	0,057		0,043			0,044		0,052
Lambda_z inferior	h	8		8			8		8
Lambda_z superior	h	48		48			48		48
HL_Lambda_z	h	12,27		16,44			15,61		13,67
Tmax	h	0,25		0,25			0,25		0,3125
Cmax	ng/ml	5998,6		5802,3			7821,4		8655,8
C0	ng/ml	6861,4		6662,5			9280,1		9149,9
AUCINF_obs	h*/ng/ml	53714,9		52962,1			69435,8		86554,6
Vz_obs	ml/kg	82,46		113,10			81,65		58,06
Cl_obs	ml/h/kg	4,65		4,74			3,61		2,92

(continuación)

Isómero de PEG 30K	Intravenoso 0,25 mg/kg							
MRTINF_obs	h	14,49		13,81			16,18	14,83
Vss_obs	ml/kg	67,46		65,53			58,53	43,48

Propiedades de PK de isómero de PEG de FGF21-SC

Isómero de PEG 30K	Subcutáneo 0,251 mg/kg								
		R72	R77	H87	E91	Y104	E110	R126	P146
Lambda_z	1 h			0,043	0,035				0,0317
Lambda_z inferior	h	24		24	24				24
Lambda_z superior	h	96		90	96				96
HL_Lambda_z	h	14,72		16,14	19,93				22,01
Tmax	h	24		24	22				24
Cmax	ng/ml	254,5		174,3	229,7				321,3
AUCINF_obs	h*/ng/ml			8206,7	12177,2				15908,4
Vz_obs	ml/kg	458,9		731,1	606,2				503,4
Cl_obs	ml/h/kg	21,92		31,67	20,91				15,86
MRTINF_obs	h	36,52		36,31	40,35				40,07
Tmax aumentada de compuestos pegilados									
T1/2 aumentado de compuestos pegilados									
AUC aumentada de compuestos pegilados									
Atributos de PK dependientes de sitio de pegilación									

5 Ejemplo 29Estudios *in vivo* de FGF-21 PEGilado

Se administran PEG-FGF-21, FGF-21 no modulado y solución de tampón a ratones o ratas. Los resultados mostrarán actividad superior y semivida prolongada del FGF-21 PEGilado de la presente invención en comparación con FGF-21 no modificado. De forma similar, se administran FGF-21 modificado, FGF-21 no modificado y solución de tampón a ratones o ratas.

Análisis farmacocinético

El documento WO 2005/091944 describe estudios farmacocinéticos que pueden realizarse con los compuestos de FGF-21 de la presente invención. Se administra un polipéptido de FGF-21 de la invención por vías intravenosa o subcutánea a ratones. Se toman muestras sanguíneas de los animales antes y en puntos temporales después de la dosificación. Se recoge plasma de cada muestra y se analiza por radioinmunoensayo. Puede calcularse la semivida de eliminación y compararse entre polipéptidos de FGF-21 que comprenden un aminoácido no codificado de forma natural y FGF-21 de tipo silvestre o diversas formas de polipéptidos de FGF-21 de la invención. De forma similar, pueden administrarse polipéptidos de FGF-21 de la invención a monos cynomolgus. Se toman muestras sanguíneas de los animales antes y en puntos temporales de la dosificación. Se recoge plasma de cada muestra y se analiza por radioinmunoensayo.

Pueden administrarse polipéptidos de la invención a ratas macho ZDF (ratas gordas diabéticas; de 8 semanas de edad al comienzo del estudio, Charles River-GMI). Se alimenta a las ratas con pienso Purina 5008 a voluntad. Se preparan los siguientes grupos de ensayo: solución salina; insulina 4U/día; FGF-21, 500 µg/día Acute (el grupo de dosificación de Acute se dosifica una vez y se toman muestras sanguíneas a T=0, 2, 4, 8 y 24 horas después de la dosis); FGF-21, 100 µg/día; FGF-21, 250 µg/día; FGF-21, 500 µg/día; FGF-21 (una vez/día) 500 µg/ml; Solución Salina Delgadas; Insulina 4U/día Delgadas; FGF-21 500 µg/día Delgadas. Los grupos de delgadas representan ratas ZDF delgadas no diabéticas.

Los compuestos se inyectan s.c. (dos veces al día) excepto para el segundo grupo de 500 µg/día que recibe una inyección por día durante el transcurso del estudio (7 días). Se inyecta vehículo a ratas control (PBS; 0,1 ml). Después de 7 días de dosificación, se somete a los animales a un ensayo de tolerancia a glucosa oral. Se recoge sangre para glucosa y triglicéridos por sangrado con pinza de la cola sin anestesia. Los polipéptidos de FGF-21 pueden reducir los niveles de glucosa en plasma de una manera dependiente de dosis. Además las ratas ZDF delgadas pueden no hacerse hipoglucémicas después de exposición a polipéptidos de FGF-21 de la invención en comparación con ratas con dosis de insulina.

Modelo de obesidad ob/ob

El modelo de ratones ob/ob es un modelo animal para hiperglucemia, resistencia a insulina y obesidad. Pueden medirse los niveles de glucosa en plasma después de tratamiento con polipéptido de FGF-21 en comparación con grupos de control de vehículo e insulina en ratones ob/ob. En este modelo de obesidad, a los grupos de ensayo de ratones ob/ob macho (7 semanas de edad) se les inyecta vehículo solo (PBS), insulina (4 U/día) o polipéptido de FGF-21 (5 µg/día y 25 µg/día), por vía subcutánea (0,1 ml, dos veces al día) durante siete días. Se recoge sangre por sangrado con pinza de la cola los días 1, 3 y 7, una hora después de la inyección del primer compuesto, y se miden los niveles de glucosa en plasma usando un protocolo convencional. Los polipéptidos de FGF-21 de la invención estimulan la captación de glucosa si reducen los niveles de glucosa en plasma en comparación con el grupo de control de vehículo. Los niveles de triglicéridos pueden compararse después de tratamiento con polipéptidos de FGF-21 de la invención en comparación con otras moléculas. El polipéptido puede administrarse al ratón mediante múltiples dosis, infusión continua o una dosis sencilla, etc.

Ejemplo 30

Evaluación farmacocinética de análogos de FGF21: Las propiedades farmacocinéticas de los análogos de FGF-21 30KPEG-pAF(N6-His) con diversos sitios de conjugación de PEG se evaluaron en rata. Otros parámetros estudiados fueron PM de PEG, así como la dosis de compuesto administrado. Se determinó el porcentaje de biodisponibilidad para varias variantes de 30KPEG-pAF(N6-His)FGF21.

Animales: Toda la experimentación animal se analizó según los protocolos aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional. Se obtuvieron ratas macho Sprague-Dawley (175-300 g) de Charles River Laboratories. Las ratas se alojaron individualmente en jaulas en habitaciones con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se aclimataron al vivario Ambrx durante al menos 3 días antes de la experimentación. Se proporcionó a los animales acceso a pienso de roedores Purina 5001 y agua a voluntad.

Dosificación y recogida de suero: Se instalaron quirúrgicamente catéteres en la vena yugular para recogida de sangre por CRL antes del envío. Después de permeabilidad de catéter exitosa, se asignó a los animales a grupos de tratamiento antes de dosificación. Se administró una dosis sencilla de compuesto por vía intravenosa o vía subcutánea en un volumen de dosis de 1 ml/kg. Las concentraciones de dosis del compuesto se derivaron por dilución en PBS usando la concentración de reserva como se asignó en el Certificado de Liberación. Se recogieron muestras sanguíneas en diversos puntos temporales mediante el catéter permanente y se pusieron en tubos de microcentrifuga SST. Se recogió suero después de la centrifugación y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Análisis farmacocinético: El ensayo para la cuantificación de PEG-FGF-21 en suero de ratas Sprague-Dawley se desarrolló en Ambrx Inc., La Jolla, CA. Se revisten pocillos de microplacas con anticuerpo policlonal IgG anti-FGF-21 humano de cabra (PAb; RnD Systems, clon AF2539) que se usa como el reactivo de captura. Se cargan muestras de patrón (STD) y control de calidad (QC), ambas preparadas mediante adiciones de análogo de PEG-FGF-21 en suero de rata Sprague Dawley 100%, y muestras de estudio en los pocillos después de pretratamiento 1:100 con tampón de bloqueo I. El FGF-21 en las muestras STD, QC y de estudio se captura por el PAb

5 inmovilizado. Los materiales no unidos se retiran lavando los pocillos. Se añade PAb IgG anti-FGF-21 humano de cabra con biotina (RnD Systems, clon BAF2539) a los pocillos seguido de una etapa de lavado y la adición de peroxidasa de rábano rusticano con estreptavidina (SA-HRP; RnD Systems, N° de Catálogo DY998) para detección del PEG-FGF-21 capturado. Después de otra etapa de lavado, se añade solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB, Kirkegaard Perry Laboratories) a los pocillos. La TMB reacciona con el peróxido en presencia de HRP y produce una señal colorimétrica proporcional a la cantidad de análogo de PEG-FGF-21 unida por el reactivo de captura en la etapa inicial. El desarrollo del color se detiene mediante la adición de ácido sulfúrico 2N y la intensidad del color (densidad óptica DO) se mide a 450 nm. La conversión de unidades de DO para las muestras de estudio y las QC a concentración se consigue a través de una comparación mediada por software informático con una curva patrón en la misma placa, de la que se realiza regresión de acuerdo con un modelo de regresión logística de 5 parámetros usando el paquete de reducción de datos SOFTmax Pro v5. Los resultados se presentan en unidades de concentración ng/ml.

15 Las concentraciones también pueden medirse por un ensayo de tipo sándwich de doble anticuerpo u otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Las concentraciones se calcularon usando una curva patrón generada a partir del compuesto dosificado correspondiente. Los parámetros farmacocinéticos se estimaron usando el programa de modelado WinNonlin (Pharsight, versión 4.1). Se usó análisis no compartimentalizado para los datos de animales individuales con integración trapezoidal lineal hacia arriba/logarítmica hacia abajo, y los datos de concentración se ponderaron uniformemente.

20 Conclusiones: Las propiedades farmacocinéticas de FGF-21 N6-His WT estaba en consonancia con las presentadas por Kharito-nenkov y col, 2005 y fueron comparables a la proteína de FGF-21 WT no marcada.

Los perfiles farmacocinéticos de los isómeros de 30KPEG-pAF(N6-His)FGF21 aumentaron significativamente mediante la adición de una molécula de PEG de 30 kDa en comparación con los resultados obtenidos de FGF-21 WT (no PEGilado).

25 Los compuestos PEGilados mostraron perfiles de PK notablemente diferentes cuando se dosificaron por vía subcutánea al nivel de 0,25 mg/kg. H87 y L86 tendían a tener un atributo de PK inferior en comparación con los otros isómeros. Además, los compuestos R131 y Q108 PEG30 generaron propiedades de PK superiores de forma diferencial. Más específicamente, estos compuestos tenían AUC, Cmax y semivida terminal mejoradas. Un análisis de la actividad estructural en profundidad puede revelar explicaciones estructurales para las diversas propiedades de PK de cada isómero.

30 La comparación del peso molecular de PEG mostró que 30KPEG-pAF91(N6-His)FGF21 tenía una persistencia ligeramente mayor en circulación que 20KPEG-pAF91(N6-His)FGF21. Sin embargo, como el isómero de 20 kDa tenía un valor de Cmax más alto, la AUCinf total para dos compuestos era comparable. La biodisponibilidad para la isoforma de 20 kDa fue ligeramente mejor que la variante de 30 kDa a 30% frente a 20%, respectivamente.

35 Tabla 3. Valores de parámetros farmacocinéticos para los compuestos dosificados por vía subcutánea a 0,25 mg/kg en rata.

0,25 mg/kg SC	t _{1/2} terminal	Tmax	Cmax	AUC _{todo}	AUC _{INF}	Vz/f	Cl/f	MRT _{INF}
	h	h	ng/ml	h*ng/ml	h*ng/ml	ml/kg	ml/h/kg	h
N6His WT	1,26	0,9	92,1	261,6	297,3	1768,9	971,2	2,52
PP WT	1,19	1,5	96,6	259,8	294,7	1576,2	910,4	2,53
R72	14,72	24	254,5	NE	11824,7	458,9	21,9	36,52
R77	32,30	22	237,0	144571,9	17687,8	655,8	14,4	59,18
L86	33,90	27	52,2	3215,7	3928,8	3153,3	66,0	59,27
H87	16,14	24	174,3	NE	8206,7	731,1	31,7	36,31
E91	19,93	22	229,7	NE	12177,2	606,2	20,9	40,35
Y104	12,37	24	321,9	19085,8	21188,1	416,3	11,9	47,63

ES 2 385 114 T3

0,25 mg/kg SC	t _{1/2} terminal	Tmax	Cmax	AUC _{todo}	AUC _{INF}	Vz/f	Cl/f	MRT _{INF}
	h	h	ng/ml	h*ng/ml	h*ng/ml	ml/kg	ml/h/kg	h
Q108	27,31	24	590,3	31837,4	36387,1	272,4	7,0	51,71
R126	16,48	20	248,1	13238,3	15033,4	643,0	16,8	49,57
R131	26,13	24	545,4	27373,4	30786,0	315,0	8,3	50,41
P146	22,01	24	321,3	NE	15908,4	503,4	15,9	40,07

5 Se evaluaron las curvas de concentración en suero frente a tiempo por análisis no compartimental (Pharsight, versión 4.1). N=3-4 ratas por compuesto. ND: no realizado; NE: no evaluado. Tmax: tiempo para alcanzar Cmax; Cmax: concentración máxima; t_{1/2} terminal: semivida terminal; AUC_{última}: área bajo la curva de concentración-tiempo para la última muestra de plasma/punto temporal; AUC_{inf}: área bajo la curva de concentración-tiempo extrapolada al infinito; MRT: tiempo de residencia media; Cl/f: eliminación de plasma total aparente; Vz/f: volumen aparente de distribución durante la fase terminal.

Tabla 4. Valores de parámetros farmacocinéticos para 20KPEG-pAF91(16-hHis)FGF21 dosificado por vía subcutánea a 0,25 mg/kg en rata.

		Rata N° 1	Rata N° 2	Rata N° 3	Rata N° 4
t _{1/2} terminal	h	22,6	24,4	17,3	16,9
Tmax	h	8	8	8	24
Cmax	ng/ml	163,0	182,1	155,7	88,8
AUC _{todo}	h*ng/ml	7629,1	7659,1	6461,4	4375,4
AUC _{INF}	h*ng/ml	8232,0	8333,8	6661,2	4521,7
Vz/f	ml/kg	989,8	1054,2	937,3	1347,7
Cl/f	ml/h/kg	30,4	30,0	37,5	55,3
MRT _{INF}	h	39,9	41,0	32,5	34,3

10 Se evaluaron las curvas de concentración frente a tiempo por análisis no compartimental (Pharsight, versión 4.1). ND: no realizado; NE: no pudo evaluarse. Tmax: tiempo para alcanzar Cmax; Cmax: concentración máxima; t_{1/2} terminal: semivida terminal; AUC_{última}: área bajo la curva de concentración-tiempo hasta la última muestra de plasma/punto temporal; AUC_{inf}: área bajo la curva de concentración-tiempo extrapolada hasta el infinito; MRT: tiempo de residencia medio; Cl/f: eliminación de plasma total aparente; Vz/f: volumen aparente de distribución durante la fase terminal.

Ejemplo 31

Ensayo clínico humano de la seguridad y/o eficacia de FGF-21 PEGilado que comprende un aminoácido no codificado de forma natural.

20 Objetivo Observar la seguridad y farmacocinética de FGF-21 humano recombinante PEGilado administrado por vía subcutánea que comprende un aminoácido no codificado de forma natural.

Pacientes. Se admiten en el estudio dieciocho voluntarios sanos que varían entre 20 y 40 años de edad y pesan entre 60 y 90 kg. Los sujetos no tendrán valores de laboratorio anómalos clínicamente significativos para hematología o química de suero, y tendrán una exploración toxicológica de orina, exploración de VIH y antígeno de

superficie de hepatitis B negativa. No deberían tener ningún indicio de lo siguiente: hipertensión; un historial de cualquier enfermedad hematológica primaria; historial de enfermedad hepática, renal, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinaria, metabólica, neurológica significativa; un historial de anemia o trastorno de ataques; una sensibilidad conocida a productos derivados de bacterias o mamíferos, PEG o albúmina de suero humano; consumidor habitual y en gran cantidad de bebidas que contengan cafeína, participación en cualquier otro ensayo clínico o que hayan tenido transfusión de sangre o la hayan donado en un periodo de 30 días de la entrada en el estudio; que hayan tenido exposición a FGF-21 en un periodo de tres meses de la entrada en el estudio; que hayan tenido una enfermedad en un periodo de siete días de la entrada en el estudio; y que tengan anomalías significativas en el examen físico previo al estudio o las evaluaciones de laboratorio clínicas en un periodo de 14 días de la entrada en el estudio. Todos los sujetos son evaluables con respecto a seguridad y todas las recogidas de sangre para el análisis farmacocinético se recogen como está programado. Todos los estudios se realizan con aprobación del comité de ética institucional y consentimiento del paciente.

Diseño del estudio. Este será un estudio de cruce de dos periodos, aleatorio, abierto, en centro único, de Fase I en voluntarios varones sanos. Se asignan aleatoriamente dieciocho sujetos a uno de dos grupos de secuencia de tratamiento (nueve sujetos/grupo). Se administra FGF-21 durante dos periodos de dosificación separados como una inyección s.c. de embolada en la parte superior del muslo usando dosis equivalentes del FGF-21 PEGilado que comprende un aminoácido no codificado de forma natural y el producto disponible en el mercado seleccionado. La dosis y frecuencia de administración del producto disponible en el mercado es como se indica en el prospecto. Pueden añadirse dosificación adicional, frecuencia de dosificación u otros parámetros según se desee, usando los productos disponibles en el mercado al estudio incluyendo grupos adicionales de sujetos. Cada periodo de dosificación se separa por un periodo de 14 días sin tratamiento. Los sujetos están confinados en el centro de estudio al menos 12 horas antes y 72 horas después de la dosificación durante cada uno de los dos periodos de dosificación, pero no entre los periodos de dosificación. Pueden añadirse grupos adicionales de sujetos si también van a ensayarse frecuencia, dosificación adicional u otro parámetro para el FGF-21 PEGilado. La formulación experimental de FGF-21 es el FGF-21 PEGilado que comprende un aminoácido no codificado de forma natural.

Toma de muestras sanguíneas. Se extrae sangre seriada por punción venosa directa antes y después de la administración de FGF-21. Se obtienen muestras de sangre venosa (5 ml) para determinación de las concentraciones de FGF-21 en suero a aproximadamente 30, 20 y 10 minutos antes de la dosificación (3 muestras de línea basal) y aproximadamente a los siguientes tiempos después de dosificación: 30 minutos y a las 1, 2, 5, 8, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48, 60 y 72 horas. Cada muestra de suero se divide en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se almacenan a -20 °C. Las muestras de suero se envían en hielo seco. Se realizan ensayos de laboratorio clínico en ayunas (hematología, química de suero y análisis de orina) inmediatamente antes de la dosis inicial el día 1, la mañana del día 4, inmediatamente antes de la dosificación del día 16 y la mañana del día 19.

Procedimientos bioanalíticos. Se usa un kit de ELISA para la determinación de concentraciones de FGF-21 en suero.

Determinaciones de seguridad. Se registran los signos vitales inmediatamente antes de cada dosificación (Días 1 y 16) y a las 6, 24, 48 y 72 horas después de cada dosificación. Las determinaciones de seguridad se basan en la incidencia y tipo de acontecimientos adversos y los cambios en los ensayos de laboratorio clínicos desde la línea basal. Además, se evalúan cambios desde antes del estudio en las mediciones de señales vitales, incluyendo presión sanguínea, y resultados del examen físico.

Análisis de datos. Los valores de concentración en suero posteriores a la dosis se corrigen con respecto a las concentraciones de FGF-21 de línea basal antes de la dosis restando de cada uno de los valores posteriores a la dosis la concentración de FGF-21 de línea basal media determinada promediando los niveles de FGF-21 de las tres muestras recogidas a los 30, 20 y 10 minutos antes de la dosificación. Las concentraciones de FGF-21 en suero predosis no se incluyen en el cálculo del valor medio si están por debajo del nivel de cuantificación del ensayo. Se determinan los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de concentración en suero corregidos con respecto a las concentraciones de FGF-21 de línea basal. Los parámetros farmacocinéticos se calculan por procedimientos independientes del modelo en un sistema informático Digital Equipment Corporation VAX 8600 usando la última versión del software BIOAVL. Se determinan los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración máxima en suero (C_{max}); tiempo hasta concentración máxima en suero (t_{max}); área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC) desde tiempo cero hasta el momento de la última toma de muestra sanguínea (AUC_{0-72}) calculada con el uso de la regla trapezoidal lineal; y semivida de eliminación terminal ($t_{1/2}$), calculada a partir de la constante de velocidad de eliminación. La constante de velocidad de eliminación se estima por regresión lineal de puntos de datos consecutivos en la región lineal terminal de la representación de concentración-tiempo logarítmica-lineal. Se calculan la media, desviación típica (DT) y coeficiente de variación (CV) de los parámetros farmacocinéticos para cada tratamiento. Se calcula la relación de las medias de los parámetros (formulación conservada/formulación no conservada).

Resultados de seguridad. La incidencia de los acontecimientos adversos se distribuye uniformemente entre los grupos de tratamiento. No hay cambios clínicamente significativos desde la línea basal o ensayos de laboratorio clínicos preestudio o presiones sanguíneas, y no hay cambios notables desde antes del estudio en los resultados de examen físico y mediciones de signos vitales. Los perfiles de seguridad para los dos grupos de tratamiento deberían

parecer similares.

5 Resultados farmacocinéticos. Perfiles de concentración-tiempo de FGF-21 en suero medios (no corregidos para los niveles de FGF-21 de línea basal) en los 18 sujetos después de recibir e FGF-21 PEGilado que comprende un aminoácido no codificado de forma natural en cada punto temporal medido. Todos los sujetos deberían tener concentraciones de FGF-21 de línea basal predosis dentro del intervalo fisiológico normal. Se determinan los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de suero corregidos con respecto a concentraciones de FGF-21 de línea basal medias predosis y se determinan C_{max} y t_{max} . El t_{max} medio para cualquier comparador o comparadores clínicos seleccionados es significativamente más corto que el t_{max} para el FGF-21 PEGilado que comprende el aminoácido no codificado de forma natural. Los valores de semivida terminal son significativamente más cortos para el comparador o los comparadores preclínicos ensayados en comparación con la semivida terminal para el FGF-21 PEGilado que comprende un aminoácido no codificado de forma natural.

10 Aunque el presente estudio se realiza en sujetos masculinos sanos, se anticiparían características de absorción y perfiles de seguridad similares en otras poblaciones de pacientes; tales como pacientes masculinos o femeninos con cáncer o insuficiencia renal crónica, pacientes con insuficiencia renal pediátrica, pacientes en programas de predepósito autólogo, o pacientes con cirugía electiva programada.

15 En conclusión, las dosis sencillas administradas por vía subcutánea de FGF-21 PEGilado que comprende aminoácido no codificado de forma natural serán seguras y se tolerarán bien por sujetos masculinos sanos. Basándose en una incidencia comparativa de acontecimientos adversos, valores clínicos de laboratorio, signos vitales y resultados de examen físico, los perfiles de seguridad de las formas disponibles en el mercado de FGF-21 y FGF-21 PEGilado que comprende aminoácido no codificado de forma natural serán equivalentes. El FGF-21 PEGilado que comprende aminoácido no codificado de forma natural potencialmente proporciona una gran utilidad clínica a pacientes y proveedores de cuidados sanitarios.

20 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritas en el presente documento son para fines ilustrativos solamente y que se les sugerirán a los expertos habituales en la materia diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos y estos deben incluirse dentro del espíritu y ámbito de la presente solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

TABLA 5: Secuencias citadas

SEC ID N°	Nombre de secuencia
1	<p>Aminoácidos de FGF-21 sin líder (forma P) HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYL YTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPE</p> <p>SLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAL YGSLHFDPEACSFRELLLE DGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGI LAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS</p>
2	<p>Secuencia de aminoácidos de FGF-21 sin líder (forma P), marcado con His</p> <p>MHHHHHSGHPDSSPLLQFGGQVRQRYL YTDDAQQTEAHLEIREDDG TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAL YGSLHFD PEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS</p>
3	<p>Secuencia de aminoácidos de FGF-21 con líder (forma P)- líder con 3 leucinas (forma P de 209 aminoácidos)</p> <p>MDSDETFEHSGLWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYL YTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS RFLCQRPDGAL YGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGN KSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQ GRSPSYAS</p>
4	<p>Secuencia de aminoácidos de FGF-21 con líder (forma P)- líder con 2 leucinas</p> <p>MDSDETFEHSGLWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYL TDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSR FLCQRPDGAL YGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNK SPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQ RSPSYAS</p>

<p>5</p>	<p>Secuencia de aminoácidos de FGF-21 sin líder (forma L)</p> <p>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 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser</p>
<p>6</p>	<p>Secuencia de aminoácidos de FGF-21 con líder (forma L)-líder con 3 leucinas (forma L de 209 aminoácidos)</p> <p>Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala 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 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser</p>

<p>7</p>	<p>Secuencia de aminoácidos de FGF-21 con líder (forma L)-líder con 2 leucinas (forma L de 208 aminoácidos)</p> <p>Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser</p>
<p>8</p>	<p>Secuencia de nucleótidos para FGF-21 sin líder (forma P)</p> <p>CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCCTCTCCTGCAATTGGGGGCCAAGTC CGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATGCCCCAGCAGACAGAAAGCCCA CCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGA GCCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAGCCGGGAGTTATTC AAATCTTGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATG GGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCCTGAGGCCTGCAGCTTCC GGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAAGCCC ACGGCCTCCCGTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCCGGAC CCTGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCTGCCACTACCAGGCCTGCC CCCGCACCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGGAT GTGGGCTCCTCGGACCCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGA AGCCCCAGCTACGCTTCTCTGA</p>

<p>9</p>	<p>Secuencia de nucleótidos para FGF-21 sin líder (forma P), marcado con His</p> <p>ATGCATCATCATCATATAGGGGGGCCACCCCATCCCTGACTCC AGTCCTCTCTGCAATTCGGGGCCAAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTAC ACAGATGATGCCAGCAGACAGAGAGCCACCTGGAGATCAGGGAGGA TGGGACGGTGGGGGGCTGCTGACCAAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGC AGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAG ACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCG CTCCACTTTGACCCCTGAGGCCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAG GACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCACAGCCCTCCCGCTGCAC CTGCCAGGGAACAAGTCCCAACACGGGACCTTGCACCCCGAGGACC AGCTCGCTTCTGCCACTACCAGGCTTGCCTCCCGCACCCCGGAGCC ACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCC TCTGAGCATGGTGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGGCTTC CTGA</p>
<p>10</p>	<p>Secuencia de nucleótidos para FGF-21 con líder (forma P)-líder con 3 leucinas</p> <p>ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCT GTGCTGGCTGGTCTTCTGTCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCCATCCCT GACTCCAGTCTCTCTGCAATTCGGGGGCCAAAGTCCGGCAGCGGTAC CTTACACAGATGATGCCAGCAGACAGAGCCACCTGGAGATCAG GGAGGATGGACGGTGGGGGGCTGCTGACCAAGAGCCCGAAAGTC TCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAG TCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATG GATCGCTCCACTTTGACCCCTGAGCCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTC TTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCACAGCCCTCCCGC TGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCAACACCGGACCTTGCACCCCGA GGACCAGCTCGCTTCTGCCACTACCAGGCTGCCCCCGCACCCCGG GAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCG GACCCCTGAGGCA TGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTAC GCTTCTCTGA</p>

11	Secuencia de nucleótidos para FGF-21 con líder (forma P)-líder con 2 leucinas
12	<p>Secuencia de nucleótidos para FGF-21 sin líder (forma L)</p> <p> CACCCATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTGGGG GCCAAGTCCG GCAGGGTACCTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGACGGTGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCGGGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGGCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCCT GAGCCCTGCA GCTTCCGGG GCTGCTTCTTGAGGACGGAT ACAAATGTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCCTGCA CCTGCCAGGGAACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCTT GCCACTACGAGGCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAAATCCTGG CCCCCCAGCC CCCCGATGTGGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CATGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCCCAGCTACGCTTCTCTGA </p>

Secuencia de nucleótidos para FGF-21 con líder (forma L)-líder con 3 leucinas

**ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG
 GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG CTG GGA GCC TGC CAG GCA
 CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC
 CAA GTC CCG CAG CCG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG
 ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG
 GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA
 GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA
 TCC AGG TTC CTG TGC CAG CCG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA
 TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CCG GAG CTG
 CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC
 GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CCG
 GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA
 GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC
 CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG
 GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA**

<p>14</p>	<p>Secuencia de nucleótidos para FGF-21 con líder (forma L)-líder con 2 leucinas</p> <p>ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA GTC CCG CAG CCG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CCG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CCG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA</p>
<p>34</p>	<p>Secuencia de aminoácidos de FGF-21 (<i>Rattus norvegicus</i>-ref NP_570108.1 18543365])</p> <p>Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Thr Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Lys Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser</p>

<p>35</p>	<p>Secuencia de aminoácidos de FGF-21 (<i>Mus musculus</i>-ref NP_064397.1 [9910218])</p> <p>Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser</p>
<p>36</p>	<p>Secuencia de aminoácidos de FGF-21 (<i>Danio rerio</i>-ref NP_001038789.1 [113671792])</p> <p>Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu Arg Trp Cys Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly Thr Gln Val Arg Glu Arg Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Leu Phe Leu Glu Met Asn Pro Asp Gly Ser Val Lys Gly Ser Pro Glu Lys Asn Leu Asn Cys Val Leu Glu Leu Arg Ser Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Ile Gln Ser Ala Ala Thr Ser Leu Tyr Leu Cys Val Asp Asp Gln Asp Lys Leu Lys Gly Gln His His Tyr Ser Ala Leu Asp Cys Thr Phe Gln Glu Leu Leu Leu Asp Gly Tyr Ser Phe Phe Leu Ser Pro His Thr Asn Leu Pro Val Ser Leu Leu Ser Lys Arg Gln Lys His Gly Asn Pro Leu Ser Arg Phe Leu Pro Val Ser Arg Ala Glu Asp Ser Arg Thr Gln Glu Val Lys Gln Tyr Ile Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Gly Met Gly His Arg Ser His Leu Leu Thr Val Phe Ser Pro Ser Leu His Thr Lys Lys</p>

Secuencia de aminoácidos de Klotho beta (*Homo sapiens*-ref | NP_783864.1 | [28376633])

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITR YRNTMSNGGLQRSVLSALILLRAVT
 GFSGDGRAIWSKNPFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWK
 KDGGPSIWDHFIHTLKNVSSSTNGSSDSYIFLEKDL S ALDFIGVSFYQFSI
 SWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEIVTL YHWDLPLALQE
 KYGGWKNDTHIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITHNPYLVAWHGYGTG
 MHAPGEKGNLAAVYTVGHNLKKAHSKVWHNYNTHFRPHQKQWL SITLG
 SHWIEPNRSENTMDIFKQQSMVSVLGFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS
 VLPFSEAEKHEMRGTADFFAFSGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNREAL
 NWIKLEYNNPRILAEANGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD
 EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYY
 KQIIRENGFSLKESTPDVQQQFPCDFS WGVTE SVLKPESVASSPQFSDPHL
 YVWNA TGNRLLRHR VEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYR
 FALD WASVLP TGNLSA VNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTL YYPTHA
 HLG LPEPLLHADGWLNPNSTAEAFQYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRL
 SDIYNRS GNDTYGA AHNLLVAHALA WRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHAD
 WAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIA WFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKH
 RRG LSSALPRLTEAERLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSR YDSD
 RDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGV RKLRLWVRRNYGDMDIYTTASGIDDQ
 ALEDDRLRKY YLGKYLQEV LKAYLIDKVRJKGYAFKLAEEKSKPRFGFF
 TSDFKAKSSIQFY NKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPL
 IFLGCCFFSTL VLLLSIAIFOROKRRKFWKAKNLQH IPLKKGKRVVS

38	<p>Secuencia de aminoácidos de Klotho beta (<i>Mus musculus</i>-refNP_112457.1 GI: 13626032)</p> <p>MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMNRRALQRSVLSAFVLLRA VTGFGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTPKFNFSWVGTFGAFQVEG SWKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYFLEKDLLALDFLGVSF YQFSISWPRLLFPNGTVAAVNAQGLRYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDL PLTLQEEYGGWKNA TMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWTIHNPYLVAW HGFGTGMHAPGEKGNLTA VYTVGHNLKKAHSAVWHNYDKNFRPHQKG WLSITL GSHWIEPNRIDN MEDVINCQHSMSVVGWFANPIHGDGDYPEF MKTGAMIEFSEAEKEEVGTADFFAFSGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLN LRQVLNWKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAAYMMKNFLNQVLQ AIKFDEIRVFGYTAWTLDDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSS AHYKQIQDNGFPLKESTPDMKGRPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFT DPHLVYVWVNTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKRVEMLAKMKV THYQFALD WTSILPTGNLSKVNRLRYRVCVSEGLKLGVPFPMVTLYH PTHSHLGLPLPLSSGGWLNMTAKAFQDYAELCFRELGDLVKLVWITINE PNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHL YDRQYRPVQHGAVSLS LHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEJAFADPLFKTGDYPSVMKEYI ASKNQRGLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVIHKQLNTR SVADRQVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVKLLAWIRRNRYRDRDIYTAN GIDDLALEDQIRKYYLEKYVQEALKA VLIDKVKIKGYAFKLTTEKSKP RFGFTSDFRAKSSVQFYSKLSSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCITCSFLV EKKPLIFFGCCFISTLA VLLSITVFHHQKRRKFKQKARNLQ NIPLKKGHSRVFS</p>
39	<p>Secuencia líder de nucleótidos de OmpA</p> <p>atgaaaaaacgtatcgcgatgctgttagctctgctggctggttcgaccgtagtaacgct</p>
40	<p>Secuencia líder de aminoácidos de OmpA</p> <p>MKKTAI A I A V A L A G F A T V A N A</p>

41	<p>Secuencia líder de nucleótidos de MalE</p> <p>atgaaataaaacagggcagcgcattcctcgcaattatccgcattaacgacgatgattttccgcctgggctctgccc</p>
42	<p>Secuencia líder de aminoácidos de MalE</p> <p>MKIKTGARILALSALTTMMFSALSA</p>
43	<p>Secuencia líder de nucleótidos de StII</p> <p>atgaaaaagaatatcgcaattctcttgcaatcctatgctgtttttctattgctacaaaatgcctatgca</p>
44	<p>Secuencia líder de aminoácidos de StII</p> <p>MKKNIALLASMFVFSIATNAYA</p>

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Cujec, Thomas P.
 Mariani, Roberto
 Hays Putnam, Anna-Maria A.
 Keefe, William M.
 Knudsen, Nick
 Ho, Lillian
 10 Pinkstaff, Jason
 Kraynov, Vadim

<120> Polipéptidos de FGF-21 modificados y sus usos

15 <130> P052772EP
 <150> 60/921.297
 <151> 30-03-2007

20 <150> 60/988.060
 <151> 14-11-2007
 <160> 44

25 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
 <211> 181
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ES 2 385 114 T3

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

<210> 2
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

5

ES 2 385 114 T3

Met His His His His His His Ser Gly Gly His Pro Ile Pro Asp Ser
 1 5 10 15

Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr
 20 25 30

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

Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln
 50 55 60

Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr
 65 70 75 80

Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu
 85 90 95

His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp
 100 105 110

Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu
 115 120 125

Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala
 130 135 140

Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro
 145 150 155 160

Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu
 165 170 175

Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180 185 190

<210> 3
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

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 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

10

ES 2 385 114 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 4
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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 Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp
 20 25 30

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

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

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

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

10

ES 2 385 114 T3

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 5
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 5

ES 2 385 114 T3

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

5

<210> 6
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

ES 2 385 114 T3

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

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

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

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 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> 7
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

5

ES 2 385 114 T3

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 Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

5

cacccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gcccaagtccg gcagcggtag 60
 ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gcccacctgg agatcagggg gtaggggacg 120
 gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg 180
 ggagttattc aatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg 240
 gccctgtatg gatcgctcca cttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt 300
 gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacggcc tcccgtgca cctgccaggg 360
 aacaagtccc cacaccggga cctgcaccc cgaggaccag ctcgcttctt gccactacca 420
 ggccctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg 480

10

ES 2 385 114 T3

ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct 540
 tctctga 546

5 <210> 9
 <211> 576
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

atgcatcatc atcatcatca tagcggcggc caccatcc ctgactccag tcctctcctg 60
 caattcgggg gccaaagtcc gcagcggtag ctctacacag atgatgccca gcagacagaa 120
 gccacactgg agatcagggg ggatgggacg gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa 180
 agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccc ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca 240
 tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg gcctgtatg gatcgctcca ctttgacct 300
 gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa 360
 gccacaggcc tcccgtgca cctgccaggg aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc 420
 cgaggaccag ctgcttctt gccactacca ggctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc 480
 ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg ggctcctcgg accctctgag catggtggga 540
 ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct tctctga 576

10 <210> 10
 <211> 630
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

atggactcgg acgagaccgg gttcagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt 60
 cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc 120
 gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac 180
 ctggagatca gggaggatgg gacgggtggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc 240
 ctgcagctga aagcctgaa gccgggagtt attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg 300
 ttcctgtgcc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccacttga ccctgaggcc 360
 tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac 420
 ggccctcccgc tgcacctgcc agggaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga 480
 ccagctcgtc tcctgccact accaggcctg cccccgcac ccccgagcc acccggaatc 540
 ctggcccccc agcccccca tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc 600
 cagggccgaa gccccagcta cgcttctga 630

20 <210> 11
 <211> 627
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

ES 2 385 114 T3

```

atggactcgg acgagaccgg gttcagacac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt      60
cttctgggag cctgccaggc acaccccatc cctgactcca gtcctctcct gcaattcggg      120
ggccaagtcc ggcagcggta cctctacaca gatgatgcc agcagacaga agcccacctg      180
gagatcaggg aggatgggac ggtggggggc gctgctgacc agagccccga aagtctcctg      240
cagctgaaag ccttgaagcc gggagttatt caaatcttgg gagtcaagac atccaggttc      300

ctgtgccagc ggccagatgg ggccctgtat ggatcgctcc actttgacce tgaggcctgc      360
agcttccggg agctgcttct tgaggacgga tacaatgttt accagtccga agcccacggc      420
ctcccgtgc acctgccagg gaacaagtcc ccacaccggg accctgcacc cggaggacca      480
gctcgcttcc tgccactacc aggctgccc cccgcacccc cggagccacc cggaatcctg      540
gccccccagc cccccgatgt gggctcctcg gaccctctga gcatggtggg accttcccag      600
ggccgaagcc ccagctacgc ttctga                                           627

```

5
<210> 12
<211> 545
<212> ADN
<213> homo sapiens
<400> 12

```

caccocatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag      60
ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gcccacctgg agatcagggg ggatgggacg      120
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg      180
ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg      240
ggccctgatg gatcgctcca ctttgacct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt      300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg      360
aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctcgcttctt gccactacca      420
ggcctgcccc ccgcactccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg      480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ctttcccagg gccgaagccc agctacgctt      540
cctga                                                                           545

```

10
15
<210> 13
<211> 630
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 13

ES 2 385 114 T3

```

atggactcgg acgagaccgg gttcagacac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt      60
cttctgctgg gagcctgccca ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc      120
gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac      180
ctggagatca gggagatgg gacgggtggg ggcgctgctg accagagccc cgaagtctc      240
ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg      300
ttcctgtgcc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc      360
tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac      420
ggcctcccgc tgcacctgcc agggaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga      480
ccagctcgct tcctgccact accaggcctg cccccgcac tccggagcc acccggaatc      540
ctggccccc agccccccga tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc      600
cagggccgaa gccccagcta cgcttctga                                     630

```

5 <210> 14
 <211> 627
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14

```

atggactcgg acgagaccgg gttcagacac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt      60
cttctgggag cctgccaggc acaccccatc cctgactcca gtcctctcct gcaattcggg      120
ggccaagtcc ggcagcggta cctctacaca gatgatgccc agcagacaga agccccctg      180
gagatcaggg aggatgggac ggtggggggc gctgctgacc agagccccga aagtctcctg      240
cagctgaaag ccttgaagcc gggagtattt caaatcttgg gagtcaagac atccaggttc      300
ctgtgccagc ggccagatgg ggccctgtat ggatcgctcc actttgacct tgaggcctgc      360
agcttccggg agctgcttct tgaggacgga tacaatgttt accagtccga agcccacggc      420
ctcccgtgc acctgccagg gaacaagtcc ccacaccggg accctgcacc cggaggacca      480
gctcgcttcc tgccactacc aggcctgccc cccgcactcc cggagccacc cggaatcctg      540
gccccccagc cccccgatgt gggctcctcg gaccctctga gcatggtggg accttcccag      600
ggccgaagcc ccagctacgc ttcctga                                     627

```

10
 15 <210> 15
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNt mutante derivado de ARNt de Methanococcus jannaschii

20 <400> 15

```

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa      60
tccagccccgc cggacca                                     77

```

25 <210> 16
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 385 114 T3

<220>

<223> Sintetasa mutante derivada de sintetasa de Methanococcus jannaschii

<400> 16

5

```

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1           5           10
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
 20           25           30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35           40           45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50           55           60
Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65           70           75
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85           90           95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
 100          105          110

```

ES 2 385 114 T3

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His
 145 150 155 160

Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

5 <210> 17
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Methanococcus jannaschii

<400> 17

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

10 tccggcccgc cggacca 77

15 <210> 18
 <211> 88
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Un ARNt supresor ámbar optimizado

20 <400> 18

ES 2 385 114 T3

	cccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccggtctc gtaggagttc	60
	gagggttcga atccctccc tgggacca	88
5	<210> 19 <211> 89 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Un ARNt supresor de desplazamiento de fase AGGA optimizado	
	<400> 19	
	gcgagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttcct aatccggtct ctaggagtt	60
	cgagggttcg aatccctccc ctgcacca	89
15	<210> 20 <211> 306 <212> PRT <213> Artificial	
20	<220> <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-L-fenilalanina	
	<400> 20	

ES 2 385 114 T3

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
 145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

ES 2 385 114 T3

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 21
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina

<400> 21

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

5

10

ES 2 385 114 T3

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His
 145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 22
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina

10

<400> 22

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

ES 2 385 114 T3

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
 145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
 165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
 180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
 195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300

Leu
 305

<210> 23
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina

10

<400> 23

ES 2 385 114 T3

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

ES 2 385 114 T3

20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr
 145 150 155 160
 Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
 165 170 175
 Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
 180 185 190
 Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
 195 200 205
 Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220
 Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240
 Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255
 Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270
 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285
 Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300
 Leu
 305

<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina
<400> 24

ES 2 385 114 T3

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
 145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
 165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
 180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
 195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270

ES 2 385 114 T3

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300

Leu
 305

<210> 25
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

10

<400> 25

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

ES 2 385 114 T3

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 26
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

10

<400> 26

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

ES 2 385 114 T3

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 27
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

10

<400> 27

ES 2 385 114 T3

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

ES 2 385 114 T3

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His
145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 28
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

10

<400> 28

ES 2 385 114 T3

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
 20 25 30

ES 2 385 114 T3

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His
145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 29
<211> 306
<212> PRT

ES 2 385 114 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina

5

<400> 29

```

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1          5          10          15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
 20          25          30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35          40          45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50          55          60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65          70          75          80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85          90          95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
 100         105         110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115         120         125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130         135         140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His
 145         150         155         160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165         170         175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180         185         190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195         200         205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210         215         220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225         230         235         240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245         250         255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260         265         270

```

ES 2 385 114 T3

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 30
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil -fenilalanina

10

<400> 30

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His
 145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

ES 2 385 114 T3

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 31
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina

10

<400> 31

ES 2 385 114 T3

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His

ES 2 385 114 T3

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

ES 2 385 114 T3

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His
 145 150 155 160

Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 33
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

10

<400> 33

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
 20 25 30

ES 2 385 114 T3

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 34
<211> 208
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

ES 2 385 114 T3

<400> 34

```

Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys
1          5          10          15

Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile
20          25          30

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

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

Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser
65          70          75          80

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

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

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

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

Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro
145         150         155         160

Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln
165         170         175

Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
180         185         190

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

```

5

<210> 35
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<400> 35

ES 2 385 114 T3

Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile
 20 25 30

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

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

Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala His Arg Ser Pro Glu Ser
 65 70 75 80

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

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

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

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

Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp
 145 150 155 160

Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln
 165 170 175

Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
 180 185 190

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

Ala Ser
 210

<210> 36
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Danio rerio
 <400> 36

5

ES 2 385 114 T3

Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu
 1 5 10 15

Arg Trp Cys Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly
 20 25 30

Thr Gln Val Arg Glu Arg Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Leu Phe Leu Glu
 35 40 45

Met Asn Pro Asp Gly Ser Val Lys Gly Ser Pro Glu Lys Asn Leu Asn
 50 55 60

Cys Val Leu Glu Leu Arg Ser Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Ile Gln
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Thr Ser Leu Tyr Leu Cys Val Asp Asp Gln Asp Lys Leu
 85 90 95

Lys Gly Gln His His Tyr Ser Ala Leu Asp Cys Thr Phe Gln Glu Leu
 100 105 110

Leu Leu Asp Gly Tyr Ser Phe Phe Leu Ser Pro His Thr Asn Leu Pro
 115 120 125

Val Ser Leu Leu Ser Lys Arg Gln Lys His Gly Asn Pro Leu Ser Arg
 130 135 140

Phe Leu Pro Val Ser Arg Ala Glu Asp Ser Arg Thr Gln Glu Val Lys
 145 150 155 160

Gln Tyr Ile Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Gly Met
 165 170 175

Gly His Arg Ser His Leu Gln Thr Val Phe Ser Pro Ser Leu His Thr
 180 185 190

Lys Lys

<210> 37
 <211> 1043
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37

5

ES 2 385 114 T3

Met Lys Pro Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe
 1 5 10 15

Phe Ser Thr Asp Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Arg Asn Thr Met Ser Asn
 20 25 30

Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile Leu Leu Arg
 35 40 45

Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn
 50 55 60

Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr
 65 70 75 80

Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val
 85 90 95

Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp His
 100 105 110

Phe Ile His Thr His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser
 115 120 125

Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile
 130 135 140

Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro
 145 150 155 160

Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Tyr Ser
 165 170 175

ES 2 385 114 T3

Thr Leu Leu Asp Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Ile Val Thr Leu
 180 185 190

Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu Gln Glu Lys Tyr Gly Gly Trp
 195 200 205

Lys Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys
 210 215 220

Phe Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His Asn
 225 230 235 240

Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro
 245 250 255

Gly Glu Lys Gly Asn Leu Ala Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn Leu
 260 265 270

Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asn Thr His Phe Arg
 275 280 285

Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp Ile
 290 295 300

Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Thr Met Asp Ile Phe Lys Cys Gln Gln
 305 310 315 320

Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly Asp
 325 330 335

Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Arg Lys Lys Leu Phe Ser Val Leu Pro
 340 345 350

Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp Phe
 355 360 365

Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr Met
 370 375 380

Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Glu Ala Leu Asn
 385 390 395 400

Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile Ala Glu Asn
 405 410 415

Gly Trp Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile
 420 425 430

Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala Ile Arg Leu
 435 440 445

Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Leu Asp Gly
 450 455 460

Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val
 465 470 475 480

ES 2 385 114 T3

Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His
 485 490 495

Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser Leu Lys Glu Ser
 500 505 510

Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val
 515 520 525

Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe
 530 535 540

Ser Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Ala Thr Gly Asn Arg Leu Leu
 545 550 555 560

His Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ala Gln Cys Thr
 565 570 575

Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met Leu Ala Arg Met Lys
 580 585 590

Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala Ser Val Leu Pro Thr
 595 600 605

Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys
 610 615 620

Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala Met Val Thr Leu
 625 630 635 640

Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu His
 645 650 655

Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala Phe Gln Ala Tyr
 660 665 670

Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile
 675 680 685

Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Ile Tyr Asn Arg Ser Gly
 690 695 700

Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala His Asn Leu Leu Val Ala His Ala Leu
 705 710 715 720

Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala
 725 730 735

Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr
 740 745 750

Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile
 755 760 765

Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala
 770 775 780

ES 2 385 114 T3

Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser
785 790 795 800

Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr
805 810 815

Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Met His
820 825 830

Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe
835 840 845

Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile
850 855 860

Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly
865 870 875 880

Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu
885 890 895

Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu
900 905 910

Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr
915 920 925

Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe
930 935 940

Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Val
945 950 955 960

Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg Cys Ser
965 970 975

Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val Gln
980 985 990

Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu Val
995 1000 1005

Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg Lys
1010 1015 1020

Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys Lys Gly
1025 1030 1035

Lys Arg Val Val Ser
1040

<210> 38
<211> 1043
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 38

ES 2 385 114 T3

Met Lys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe
1 5 10 15

Phe Ser Ser Asp Glu Arg Asn Thr Arg Ser Arg Lys Thr Met Ser Asn
20 25 30

Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val Leu Leu Arg
35 40 45

Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp Asp Lys Lys
50 55 60

Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr
65 70 75 80

Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala Phe Gln Val
85 90 95

Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp Arg
100 105 110

Tyr Val Tyr Ser His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp Arg Ser Thr
115 120 125

Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Phe Leu
130 135 140

Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro
145 150 155 160

Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg
165 170 175

Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr
180 185 190

Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly
195 200 205

Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr
210 215 220

Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His
225 230 235 240

Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala
245 250 255

Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn
260 265 270

Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asp Lys Asn Phe
275 280 285

Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp
290 295 300

ES 2 385 114 T3

Ile Glu Pro Asn Arg Thr Asp Asn Met Glu Asp Val Ile Asn Cys Gln
 305 310 315 320

His Ser Met Ser Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly
 325 330 335

Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Phe Met Lys Thr Gly Ala Met Ile Pro Glu
 340 345 350

Phe Ser Glu Ala Glu Lys Glu Glu Val Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe
 355 360 365

Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Arg Pro Ser Asn Thr Val Val
 370 375 380

Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Gln Val Leu Asn Trp
 385 390 395 400

Ile Lys Leu Glu Tyr Asp Asp Pro Gln Ile Leu Ile Ser Glu Asn Gly
 405 410 415

Trp Phe Thr Asp Ser Tyr Ile Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr
 420 425 430

Met Met Lys Asn Phe Leu Asn Gln Val Leu Gln Ala Ile Lys Phe Asp
 435 440 445

Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Thr Leu Leu Asp Gly Phe
 450 455 460

Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp
 465 470 475 480

Phe Asn Ser Glu Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr
 485 490 495

Tyr Lys Gln Ile Ile Gln Asp Asn Gly Phe Pro Leu Lys Glu Ser Thr
 500 505 510

Pro Asp Met Lys Gly Arg Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr
 515 520 525

Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Phe Thr Val Ser Ser Pro Gln Phe Thr
 530 535 540

Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Val Thr Gly Asn Arg Leu Leu Tyr
 545 550 555 560

Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ser Gln Cys Thr Asp
 565 570 575

Tyr Val Ser Ile Lys Lys Arg Val Glu Met Leu Ala Lys Met Lys Val
 580 585 590

Thr His Tyr Gln Phe Ala Leu Asp Trp Thr Ser Ile Leu Pro Thr Gly
 595 600 605

ES 2 385 114 T3

Asn Leu Ser Lys Val Asn Arg Gln Val Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val
 610 615 620

Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Val Phe Pro Met Val Thr Leu Tyr
 625 630 635 640

His Pro Thr His Ser His Leu Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Ser Ser
 645 650 655

Gly Gly Trp Leu Asn Met Asn Thr Ala Lys Ala Phe Gln Asp Tyr Ala
 660 665 670

Glu Leu Cys Phe Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr
 675 680 685

Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Met Tyr Asn Arg Thr Ser Asn
 690 695 700

Asp Thr Tyr Arg Ala Ala His Asn Leu Met Ile Ala His Ala Gln Val
 705 710 715 720

Trp His Leu Tyr Asp Arg Gln Tyr Arg Pro Val Gln His Gly Ala Val
 725 730 735

Ser Leu Ser Leu His Cys Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Phe Val
 740 745 750

Asp Ser His Trp Lys Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala
 755 760 765

Trp Phe Ala Asp Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ser Val Met
 770 775 780

Lys Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Asn Gln Arg Gly Leu Ser Ser Ser Val
 785 790 795 800

Leu Pro Arg Phe Thr Ala Lys Glu Ser Arg Leu Val Lys Gly Thr Val
 805 810 815

Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Ile His Lys
 820 825 830

Gln Leu Asn Thr Asn Arg Ser Val Ala Asp Arg Asp Val Gln Phe Leu
 835 840 845

Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro
 850 855 860

Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp
 865 870 875 880

Arg Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Leu Ala Leu Glu
 885 890 895

Asp Asp Gln Ile Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Val Gln Glu Ala
 900 905 910

ES 2 385 114 T3

Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala
 915 920 925

Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr
 930 935 940

Ser Asp Phe Arg Ala Lys Ser Ser Val Gln Phe Tyr Ser Lys Leu Ile
 945 950 955 960

Ser Ser Ser Gly Leu Pro Ala Glu Asn Arg Ser Pro Ala Cys Gly Gln
 965 970 975

Pro Ala Glu Asp Thr Asp Cys Thr Ile Cys Ser Phe Leu Val Glu Lys
 980 985 990

Lys Pro Leu Ile Phe Phe Gly Cys Cys Phe Ile Ser Thr Leu Ala Val
 995 1000 1005

Leu Leu Ser Ile Thr Val Phe His His Gln Lys Arg Arg Lys Phe
 1010 1015 1020

Gln Lys Ala Arg Asn Leu Gln Asn Ile Pro Leu Lys Lys Gly His
 1025 1030 1035

Ser Arg Val Phe Ser
 1040

5 <210> 39
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcciones de secreción de FGF21 clonadas en pVK7ara (Nde/Eco)
 <400> 39

atgaaaaaaaa ctgctatcgc gatcgcgtgta gctctggctg gtttcgcgac cgtagctaac 60
 gct 63

15 <210> 40
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Construcciones de secreción de FGF21, clonadas en pVK7ara (Nde/Eco)
 <400> 40

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Asn Ala
 20

25 <210> 41
 <211> 78
 <212> ADN

ES 2 385 114 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Construcciones de secreción de FGF21 clonadas en pVK7ara (Nde/Eco)

5

<400> 41

```

atgaaaataa aaacaggtgc acgcatcctc gcattatccg cattaacgac gatgatgttt    60
tccgcctcgg ctctcgcc                                                    78
    
```

10

<210> 42

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Construcciones de secreción de FGF21, clonadas en pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 42

```

Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
1           5           10          15
    
```

20

```

Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala
           20          25
    
```

<210> 43

<211> 69

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> Construcciones de secreción de FGF21 clonadas en pVK7ara (Nde/Eco)

30

<400> 43

```

atgaaaaaga atatcgcatt tcttcttgca tctatgttcg ttttttctat tgctacaaat    60
gcctatgca                                                                69
    
```

35

<210> 44

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Construcciones de secreción de FGF21, clonadas en pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 44

```

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1           5           10          15
    
```

45

```

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala
           20
    
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de FGF-21 que comprende una secuencia mostrada en SEC ID N°: 1-7, excepto que se sustituye un aminoácido por un aminoácido no codificado de forma natural en la posición 108 (SEC ID N°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEC ID N°: 2-7), en el que un polímero soluble en agua se une al aminoácido no codificado de forma natural presente en dicho polipéptido de FGF-21.
2. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que el polipéptido está unido a un engarce, polímero o molécula biológicamente activa.
3. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que el polipéptido está unido a un polímero bifuncional, engarce bifuncional o al menos un polipéptido de FGF-2 adicional.
- 10 4. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 3, en el que el engarce bifuncional o polímero se une a un segundo polipéptido.
5. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 4, en el que el segundo polipéptido es un polipéptido de FGF-21.
6. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol).
- 15 7. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidracina, un grupo hidracida, un grupo semicarbácida, un grupo azida o un grupo alquino.
8. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 7, en el que el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo carbonilo.
- 20 9. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa.
10. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 9, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 50 kDa.
- 25 11. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, que se fabrica haciendo reaccionar un polipéptido de FGF-21 que comprende un aminoácido que contiene carbonilo con un polímero soluble en agua que comprende un grupo aminooxi, hidracina, hidracida o semicarbácida.
12. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 11, en el que el grupo aminooxi, hidracina, hidracida, o semicarbácida se une al polímero soluble en agua a través de un enlace de amida.
- 30 13. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, que se fabrica haciendo reaccionar un polímero soluble en agua que comprende un grupo carbonilo con un polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que comprende un grupo aminooxi, hidracina, hidracida, o semicarbácida.
14. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que el polímero soluble en agua es un polímero ramificado o de múltiples ramas.
- 35 15. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 14, en el que cada rama del polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa.
16. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que el aminoácido no codificado de forma natural comprende un resto de sacárido.
17. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 2, en el que el engarce, polímero o molécula biológicamente activa está unido al polipéptido mediante un resto de sacárido.
- 40 18. Una composición que comprende el polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. Un polipéptido de FGF-21 de acuerdo con la reivindicación 1, codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia mostrada en SEC ID N°: 8, 9, 10, 11, 12, 13, ó 14, comprendiendo dicho polinucleótido un codón selector.
- 45 20. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 19, en el que el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol).
21. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 19, en el que el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidracida, un grupo hidracina, un grupo semicarbácida, un grupo azida o un grupo alquino.

22. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 20, en el que el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa.
23. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 20, en el que el resto de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado o de múltiples ramas.
- 5 24. La composición de la reivindicación 23, en la que el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa.
25. Una composición que comprende el polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 19 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 26. Un polipéptido de FGF-21 de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un polímero soluble en agua unido por un enlace covalente con el polipéptido de FGF-21 en el aminoácido de origen no natural.
27. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 26, en el que el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol).
28. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 7, en el que el dicho aminoácido no codificado de forma natural está unido a una molécula de poli(etilenglicol).
- 15 29. Un polipéptido de FGF-21 de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos un engarce, polímero o molécula biológicamente activa, en el que dicho engarce, polímero o molécula biológicamente activa está unida al polipéptido a través de un grupo funcional del aminoácido no codificado de forma natural, que se incorpora por ribosomas al polipéptido.
30. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 29, siendo dicho polipéptido de FGF-21 monoPEGilado.
- 20 31. Un polipéptido de FGF-21 de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un engarce, polímero o molécula biológicamente activa, que está unido al aminoácido no codificado de forma natural, en el que dicho aminoácido no codificado de forma natural está incorporado por ribosomas en el polipéptido.
32. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 31, comprendiendo el polipéptido de FGF-21 un engarce, polímero o molécula biológicamente activa.
- 25 33. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo cetona.
34. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido de FGF-21 comprende una secuencia como se muestra en SEC ID N°: 1, excepto que un aminoácido está sustituido por un aminoácido no codificado de forma natural en la posición 108.
- 30 35. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que dicho aminoácido no codificado de forma natural es para-acetil-fenilalanina.
36. El polipéptido de FGF-21 de la reivindicación 1, en el que el dicho polímero soluble en agua es un resto de poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de 30 kDa.

Figura 1

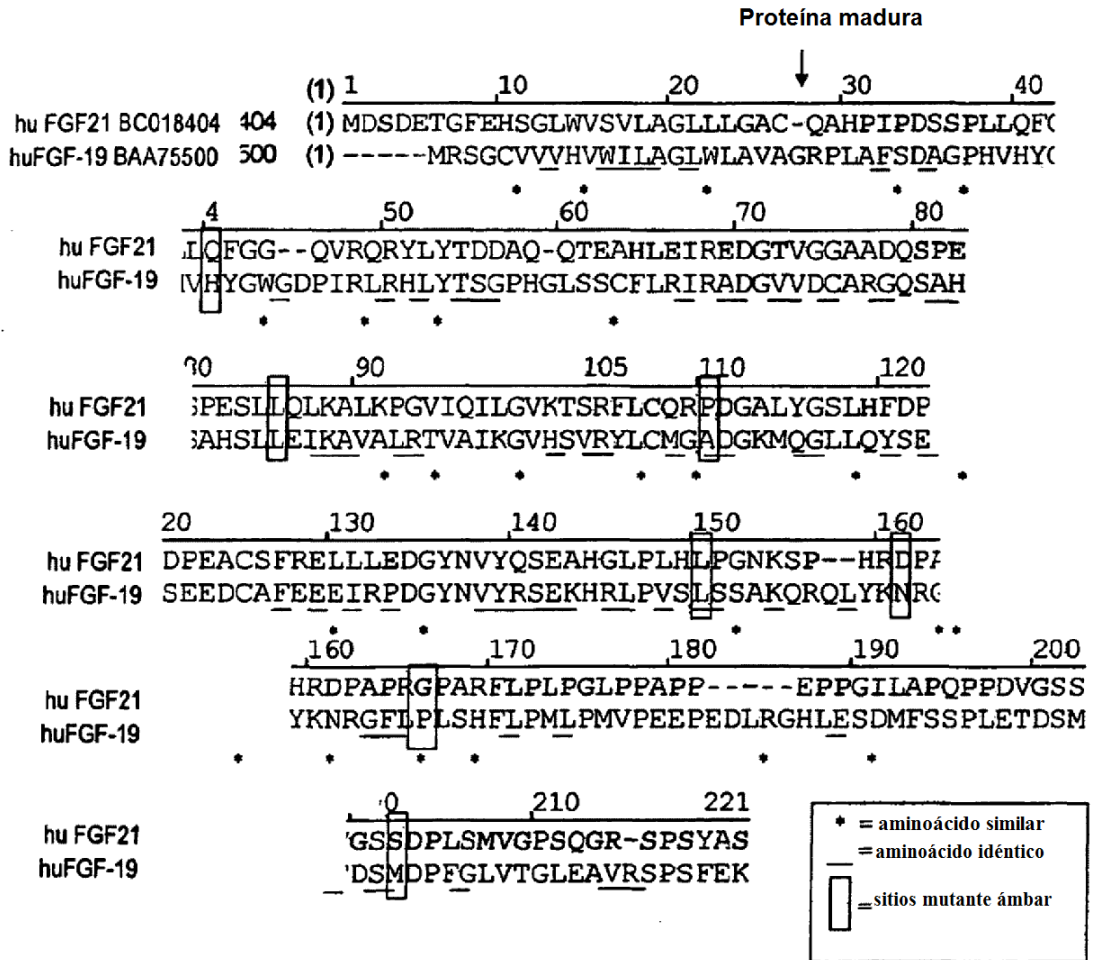


Figura 2

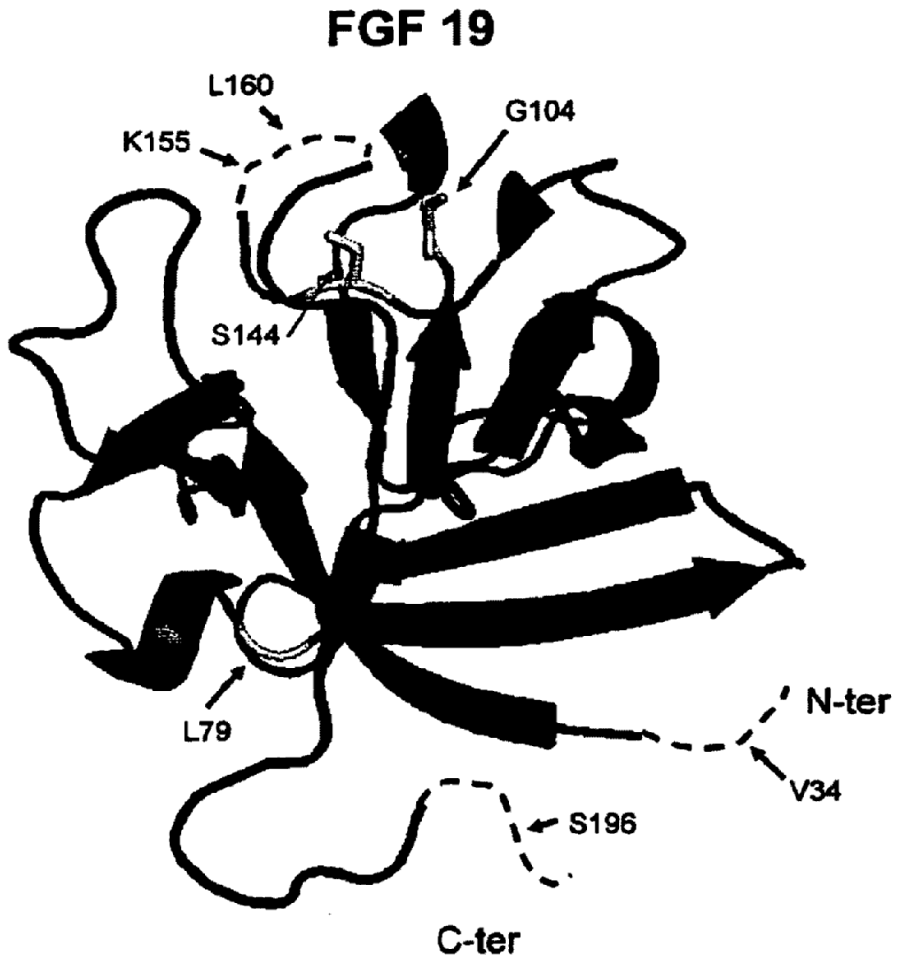


Figura 3

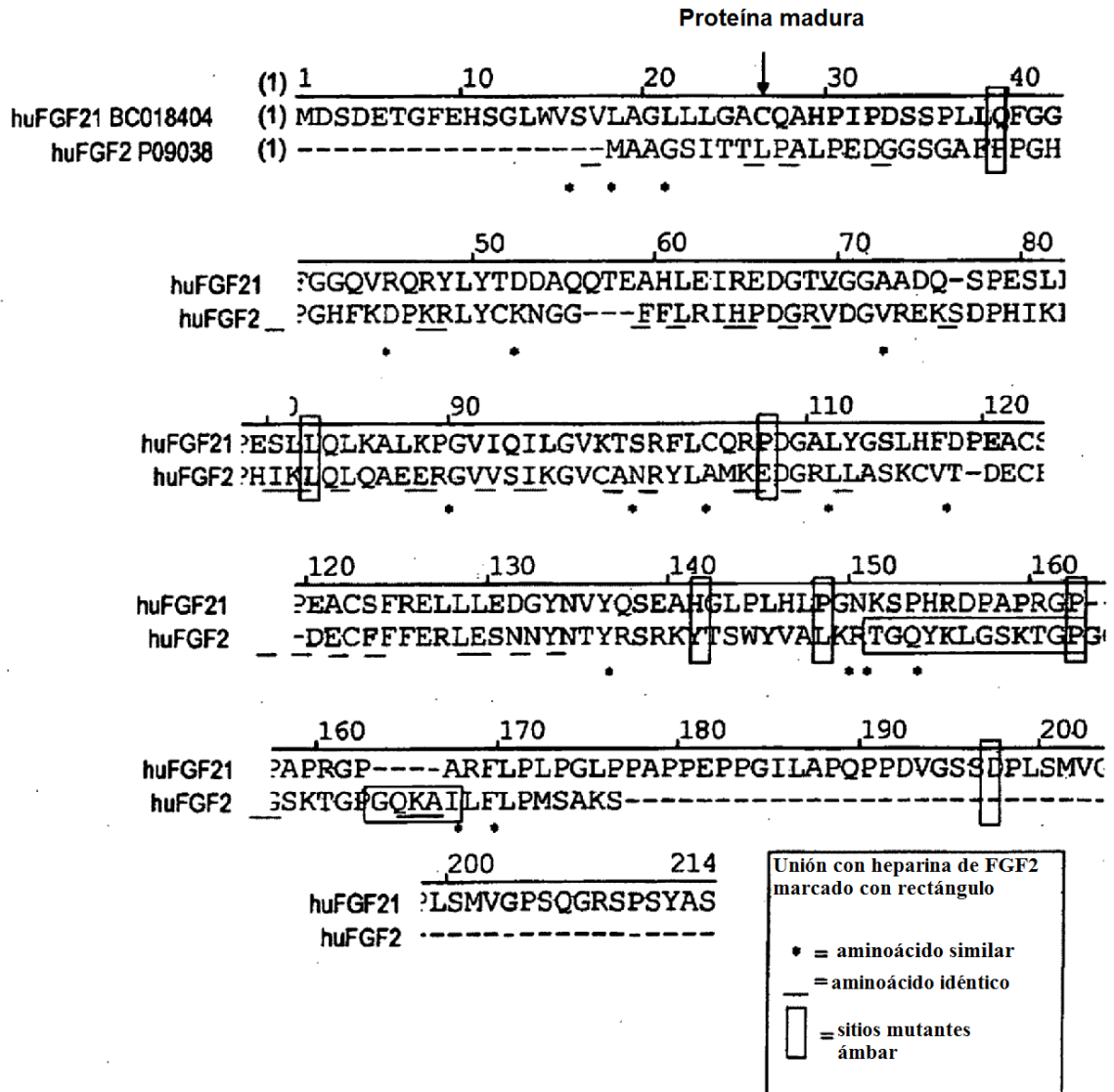


Figura 4

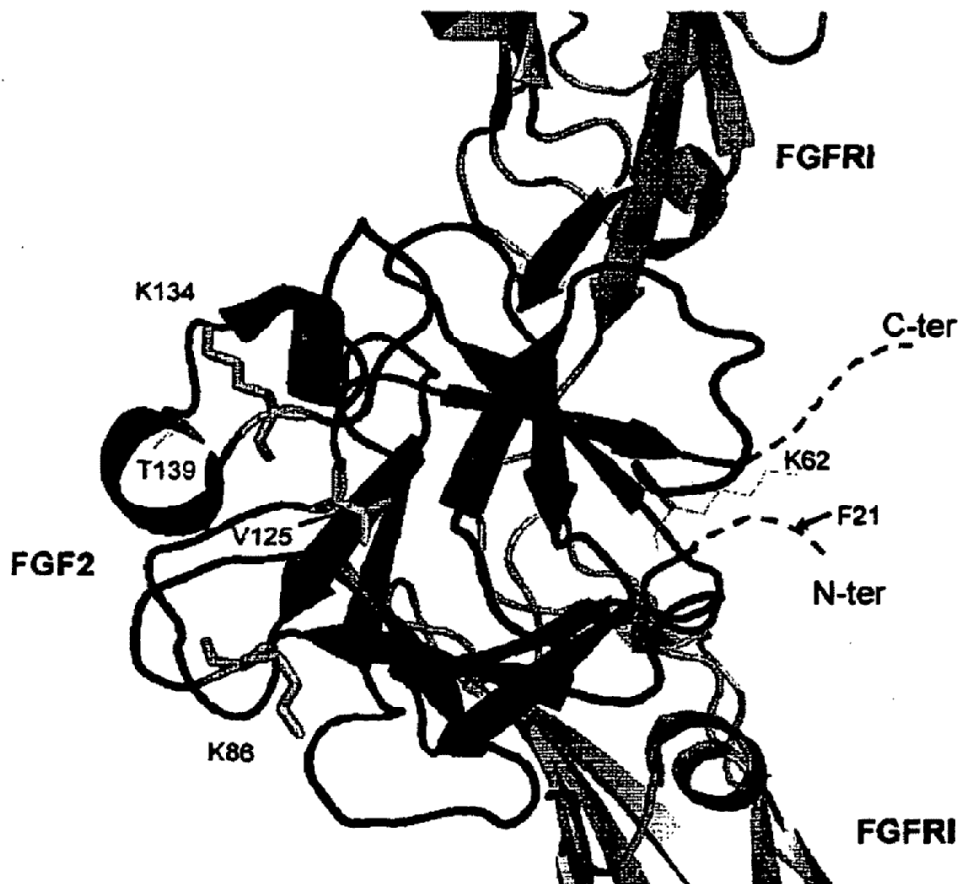


Figura 5

Sedimento de B-PER

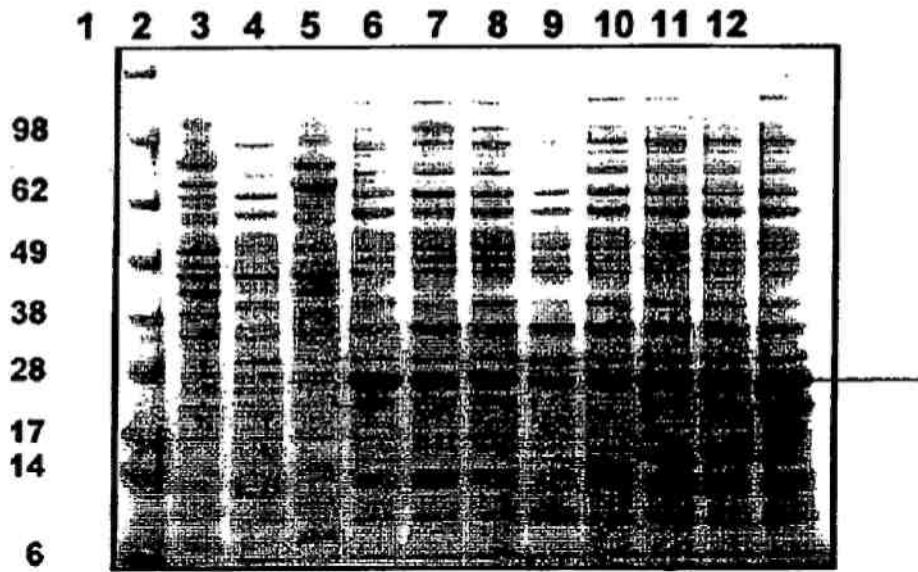


Figura 6

Sobrenadante de B-PER

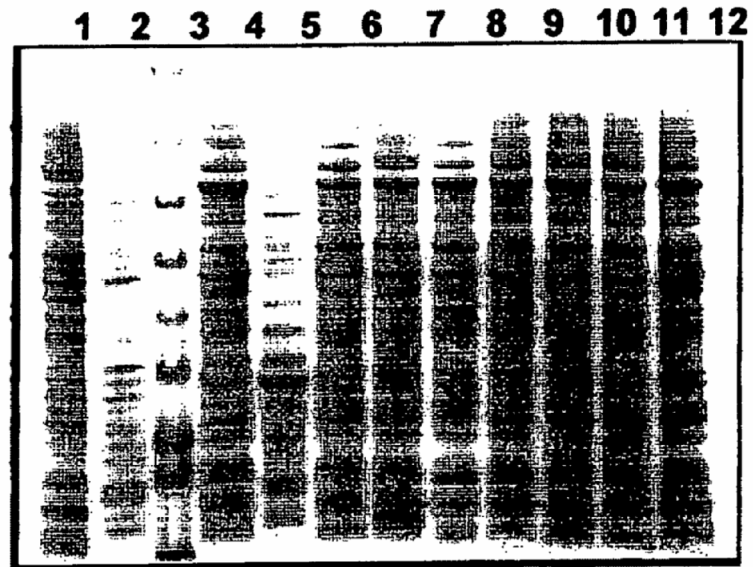


Figura7a

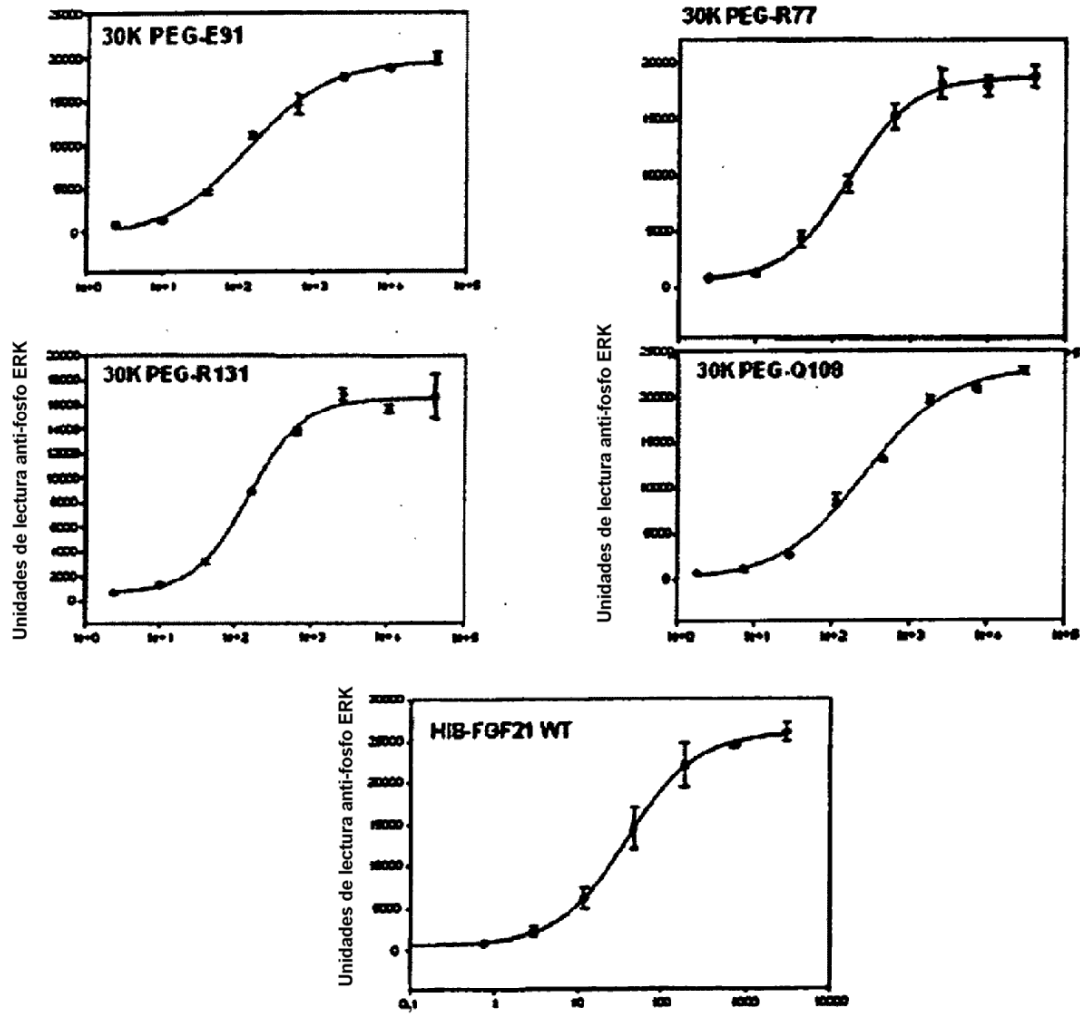
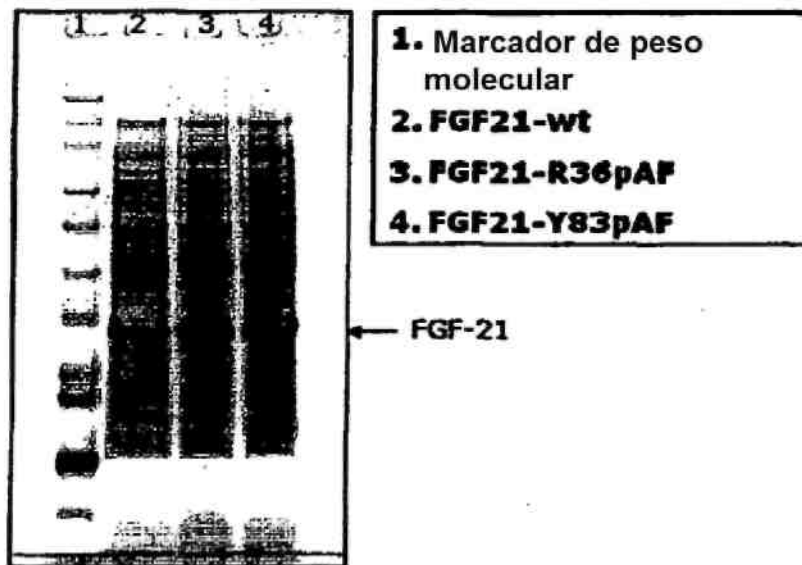


Figura 7b

Proteína	Pérdida de actividad en veces
HIS-FGF21	1
30KPEG-E91	4
30KPEG-R131	4
30KPEG-Q108	6
30KPEG R77	6
30KPEG-R72	14
30KPEG H87	19
30KPEG L86	10
30KPEG R126	11
30KPEG E110	16
30KPEG Y83	17
30KPEG-P146	22
30KPEG R135	26
30KPEG R96	47
30KPEG R36	47
30KPEG Y104	Sin actividad agonista
30KPEG L99	Sin actividad agonista
30KPEG K56	Sin actividad agonista
30KPEG Y22	Sin actividad agonista

Figura 8

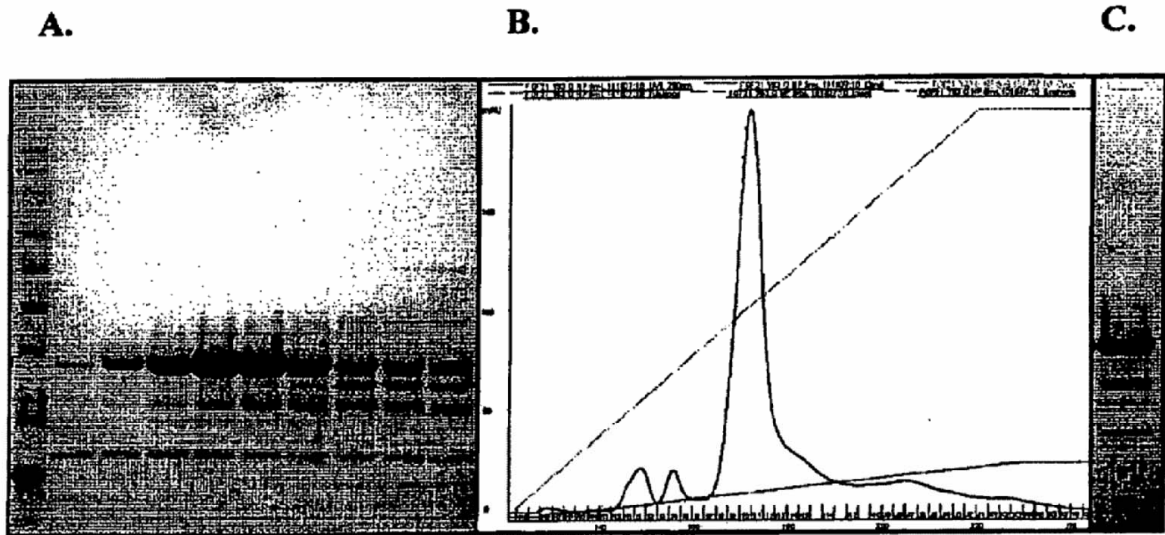
Expresión de FGF-21 no marcado



Análisis de SDS-PAGE de FGF-21 expresado en *E. coli*

Figura 9

Purificación; FGF-21-Y83pAF no marcado

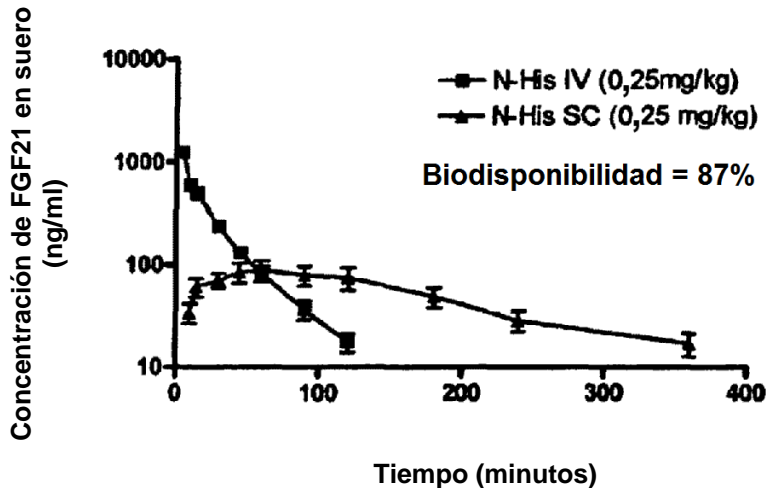


Purificación de FGF-21-Y83pAF. no marcado. A. Cromatograma de elución de Q HP. B. Análisis de SDS-PAGE de fracciones de elución de FGF-21-Y83pA. C. Análisis de SDS-PAGE de grupo de elución Q HP de FGF-21-Y83pAF

Figura 10

FGF21 WT N-His

Concentración en suero de FGF21 WT N-His después de inyección SC sencilla en rata



Concentración en suero de FGF21 WT N-His después de inyección SC sencilla en rata

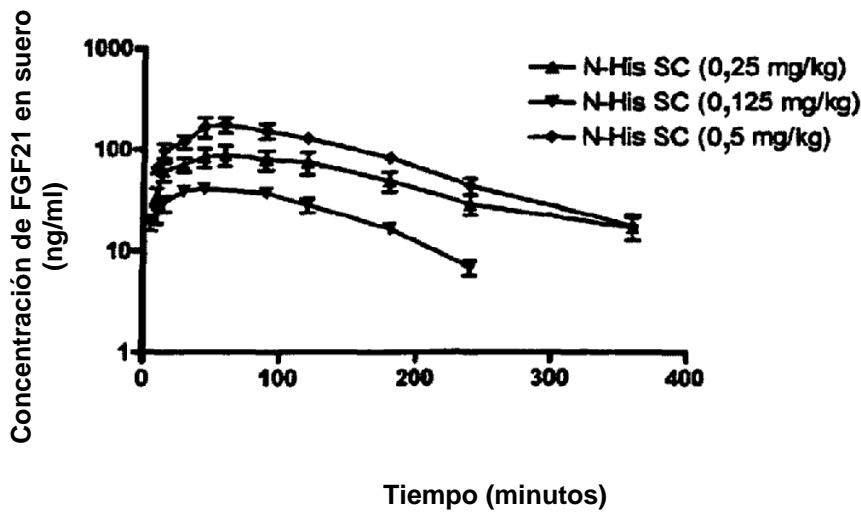
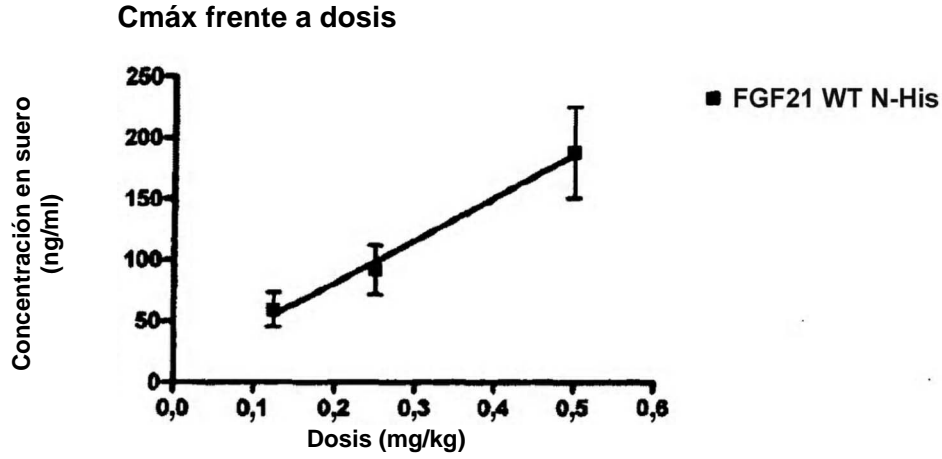


Figura 11



FGF21 WT N-His

Valores de mejor ajuste

Pendiente: $348,5 \pm 91,22$

Ordenada en el origen cuando $X = 0,0$ $11,55 \pm 30,17$

Abscisa en el origen cuando $Y = 0,0$ $- 0,03315$

$1/\text{pendiente}$ $0,002870$

Intervalos de confianza al 95%

Pendiente $145,2$ a $551,7$

Ordenada en el origen cuando $X = 0,0$ $-55,67$ a $78,77$

Abscisa en el origen cuando $Y = 0,0$ $- 0,5647$ a $0,1635$

Bondad del ajuste

r^2 $0,5934$

$Sy.x$ $49,27$

Figura 12

Semivida terminal frente a dosis

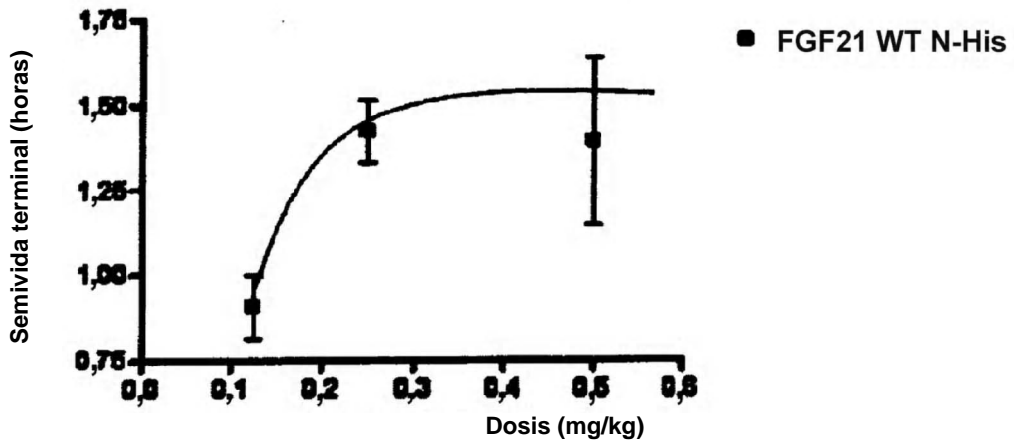
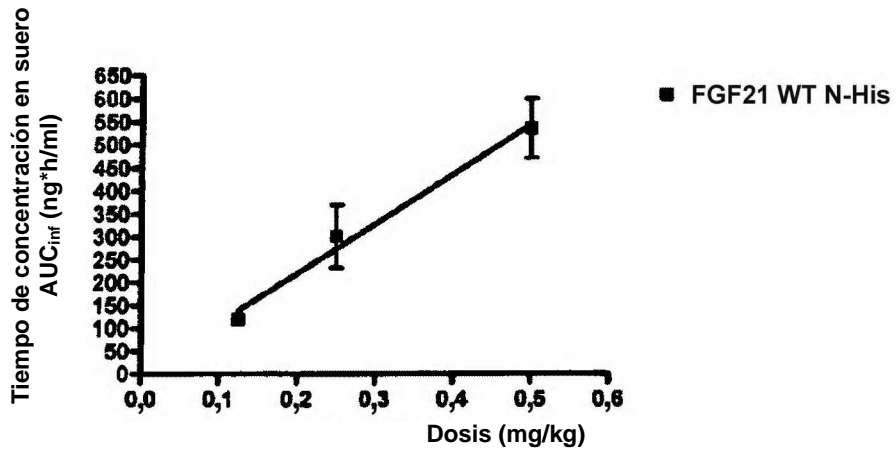


Figura 13

Concentración en suero. Tiempo frente a dosis



FGF21 WT N-His

Valores de mejor ajuste

Pendiente: $1079 \pm 194,1$

Ordenada en el origen cuando $X = 0,0$ $4,274 \pm 64,19$

Abscisa en el origen cuando $Y = 0,0$ $- 0,003959$

$1/\text{pendiente}$ $0,0009265$

Intervalos de confianza al 95%

Pendiente $646,9$ a 1512

Ordenada en el origen cuando $X = 0,0$ $-138,7$ a $147,3$

Abscisa en el origen cuando $Y = 0,0$ $- 2567$ a $0,1357$

Bondad del ajuste

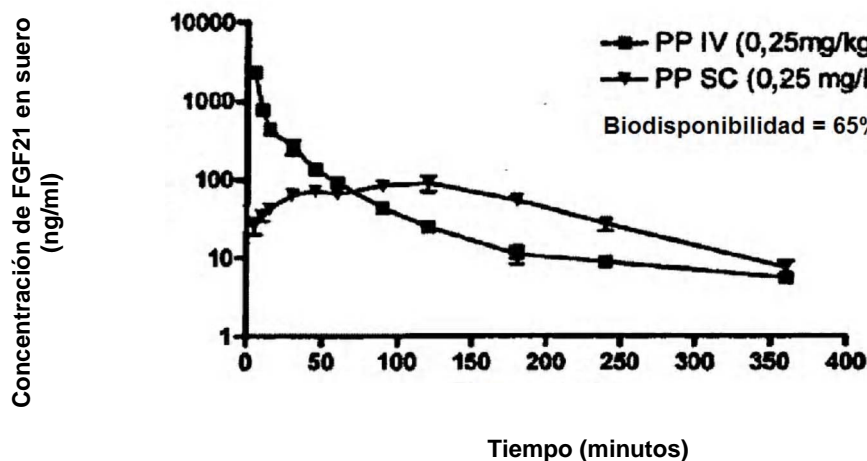
r^2 $0,7556$

$Sy.x$ $104,8$

Figura 14

FGF21 WT derivado de periplasma

Concentración en suero de FGF21 WT PP después de inyección SC sencilla en rata



Concentración en suero de FGF21 WT PP después de inyección SC sencilla en rata

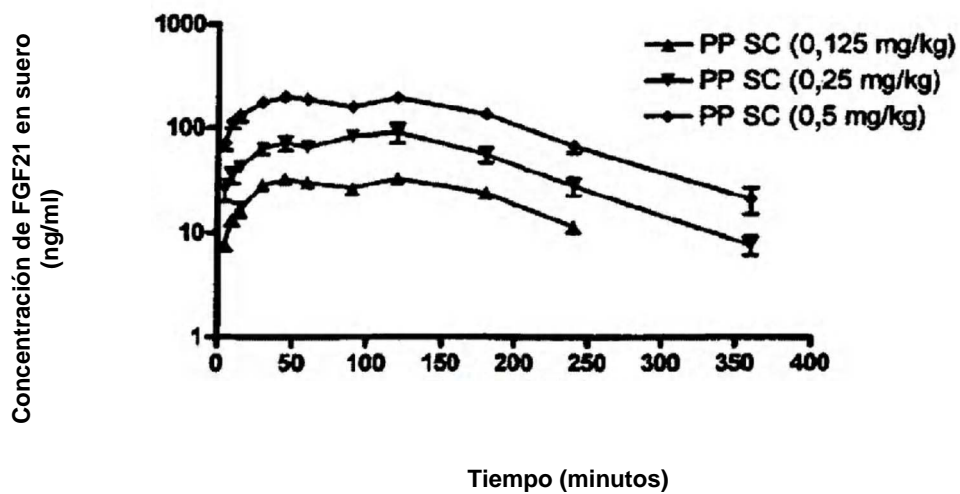
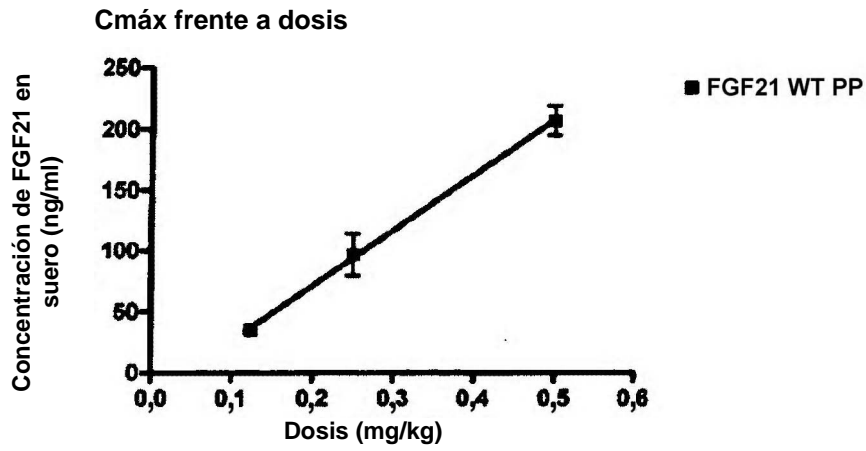


Figura 15



FGF21 WT PP

Valores de mejor ajuste
 Pendiente: $454,2 \pm 42,42$
 Ordenada en el origen cuando $X = 0,0 - 19,66 \pm 14,03$
 Abscisa en el origen cuando $Y = 0,0 - 0,04329$
 1/pendiente $0,002202$

Intervalos de confianza al 95%
 Pendiente $359,6$ a $548,7$
 Ordenada en el origen cuando $X = 0,0 - 50,92$ a $11,60$
 Abscisa en el origen cuando $Y = 0,0 - 0,55351$ a $0,1176$

Bondad del ajuste
 r^2 $0,9197$
 Sy.x $22,91$

Figura 16

Semivida terminal frente a dosis

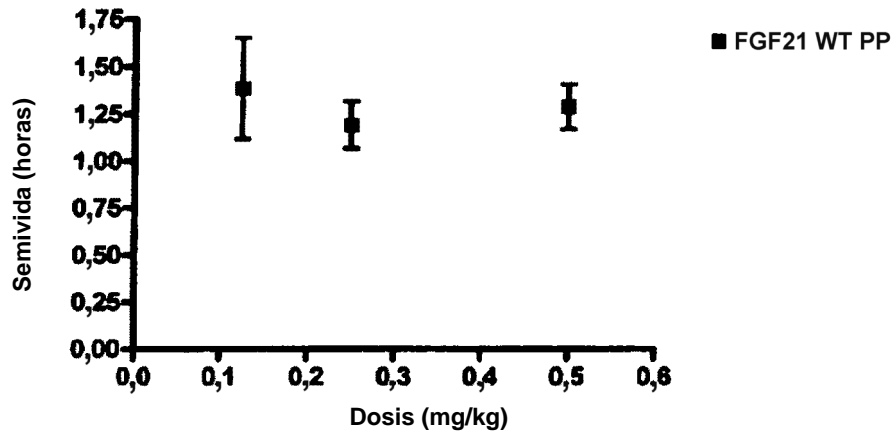
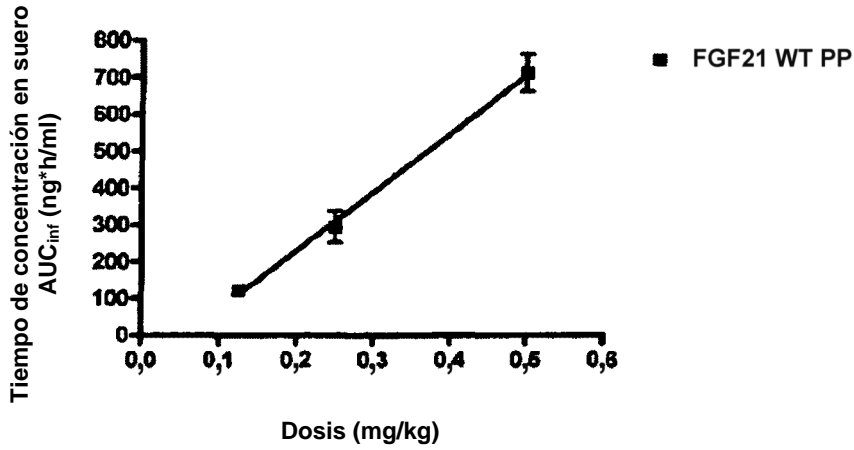


Figura 17

AUC frente a dosis



FGF21 WT PP

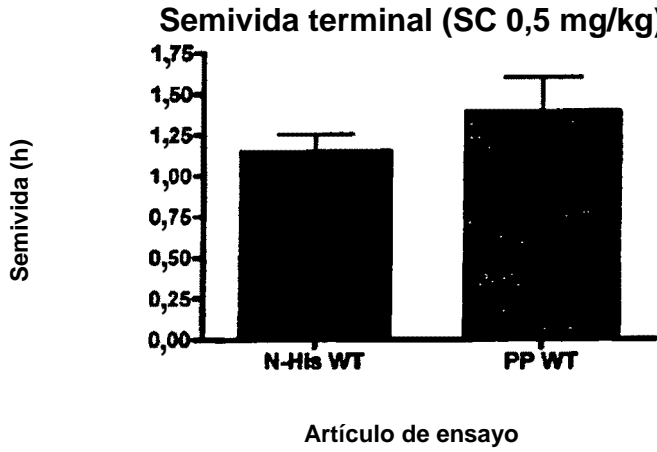
Valores de mejor ajuste
 Pendiente: $1565 \pm 137,1$
 Ordenada en el origen cuando $X = 0,0$ $-86,76 \pm 45,33$
 Abscisa en el origen cuando $Y = 0,0$ $0,05474$
 $1/\text{pendiente}$ $0,0006309$

Intervalos de confianza al 95%
 Pendiente 1280 a 1890
 Ordenada en el origen cuando $X = 0,0$ $-187,8$ a $14,25$
 Abscisa en el origen cuando $Y = 0,0$ $-0,03184$ a $0,1230$

Bondad del ajuste
 r^2 0,9304
 $Sy.x$ 74,03

Figura 18

**FGF-R-003
Comparación con WT**

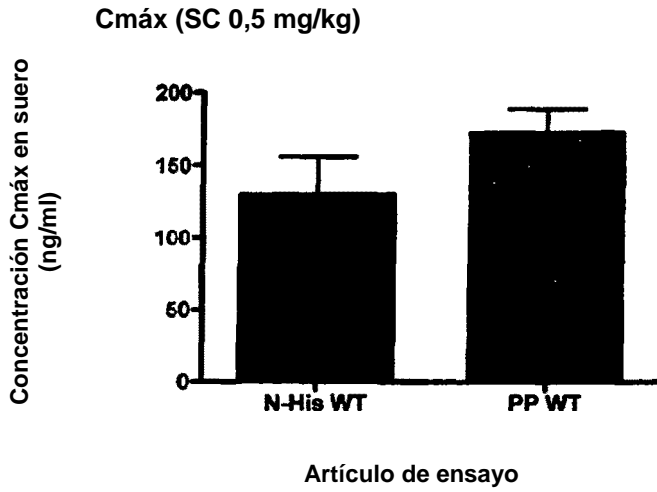


Parámetro	Valor
Tabla analizada	HL
Columna A	N-His-WT
frente a	frente a
Columna B	PP WT

Ensayo de t de muestras no relacionadas
 Valor p 0,3540
 Sumario Valor p ns
 ¿Son las medias significativamente diferentes? (P < 0,05) No
 ¿Valor p de una o dos colas? dos colas
 t, df t = 0,9772 df = 9

Figura 19

**FGF-R-003
Comparación con WT**



Parámetro	Valor
Tabla analizada	C _{máx}
Columna A	N-His-WT
frente a	frente a
Columna B	PP WT

Ensayo de t de muestras no relacionadas
 Valor p 0,1785
 Sumario Valor p ns
 ¿Son las medias significativamente diferentes? (P < 0,05) No
 ¿Valor p de una o dos colas? dos colas
 t, df t = 1,459 df = 9

Figura 20

**FGF-R-003
Comparación con WT**

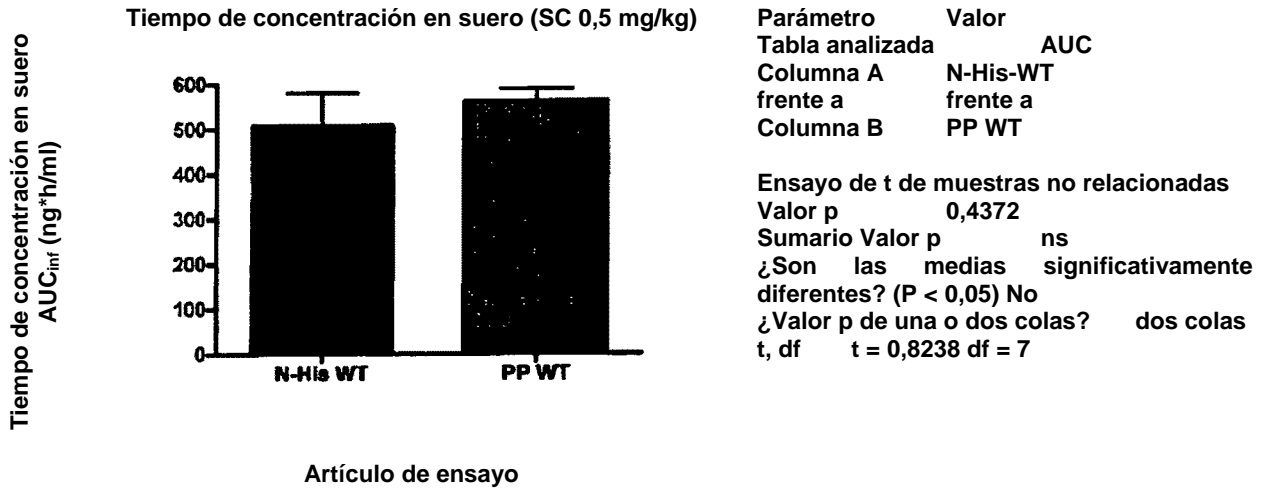
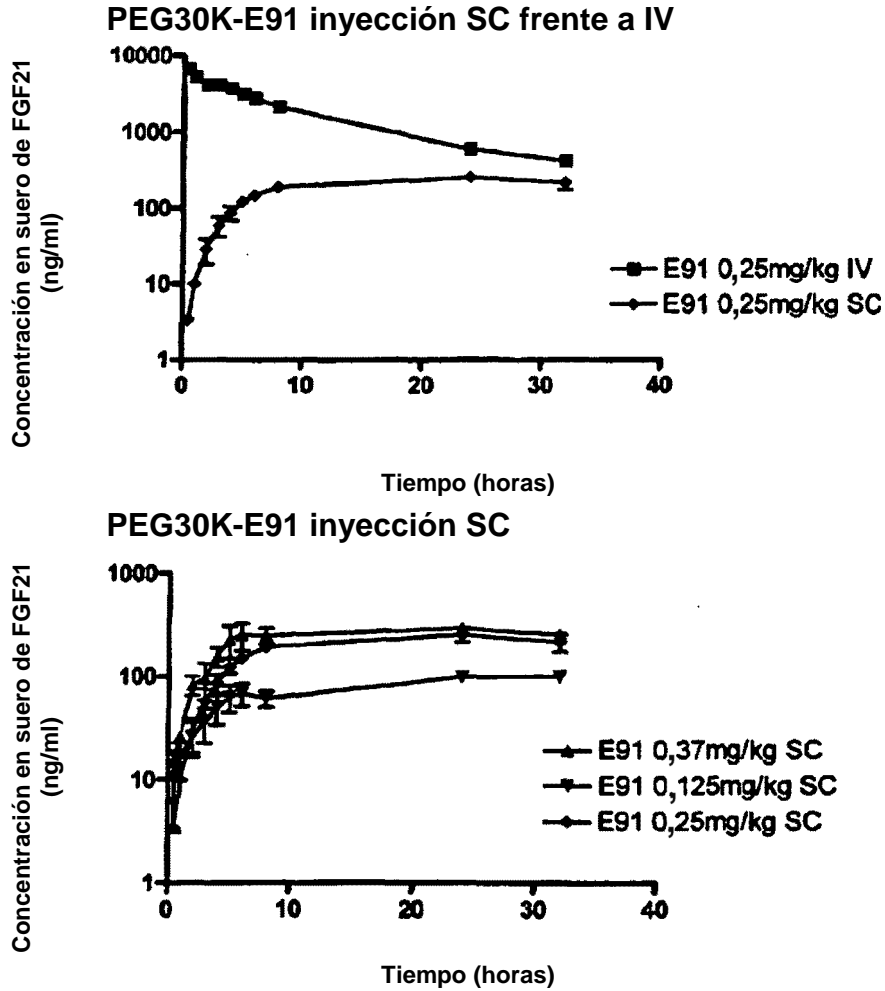


Figura 21

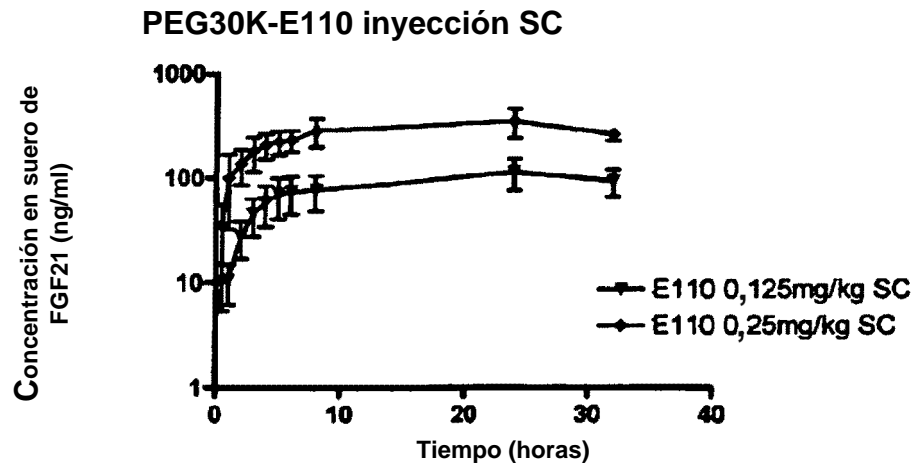
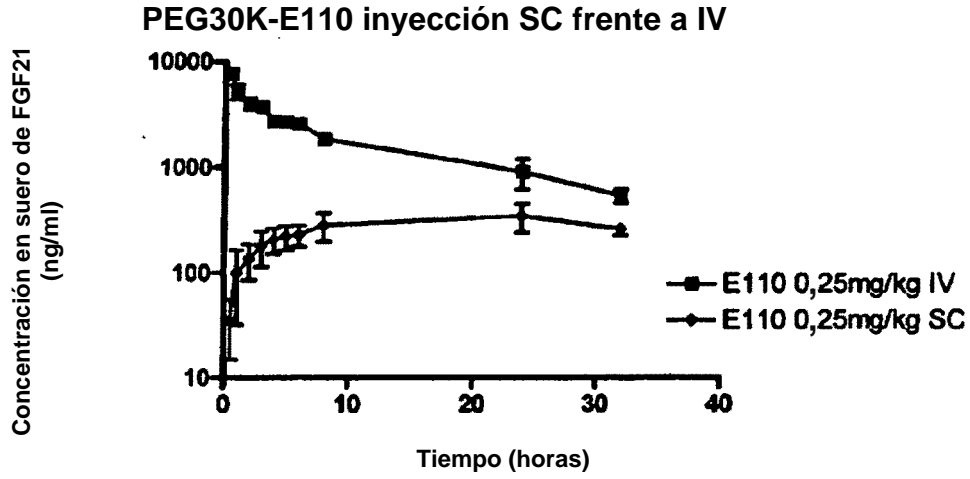
FGF-R-004 PEG PK parte 1



* Biodisponibilidad reducida

Figura 22

FGF-R-004 PEG PK parte 1



* Biodisponibilidad reducida

Figura 23

Comparación de PEG PK parte 2

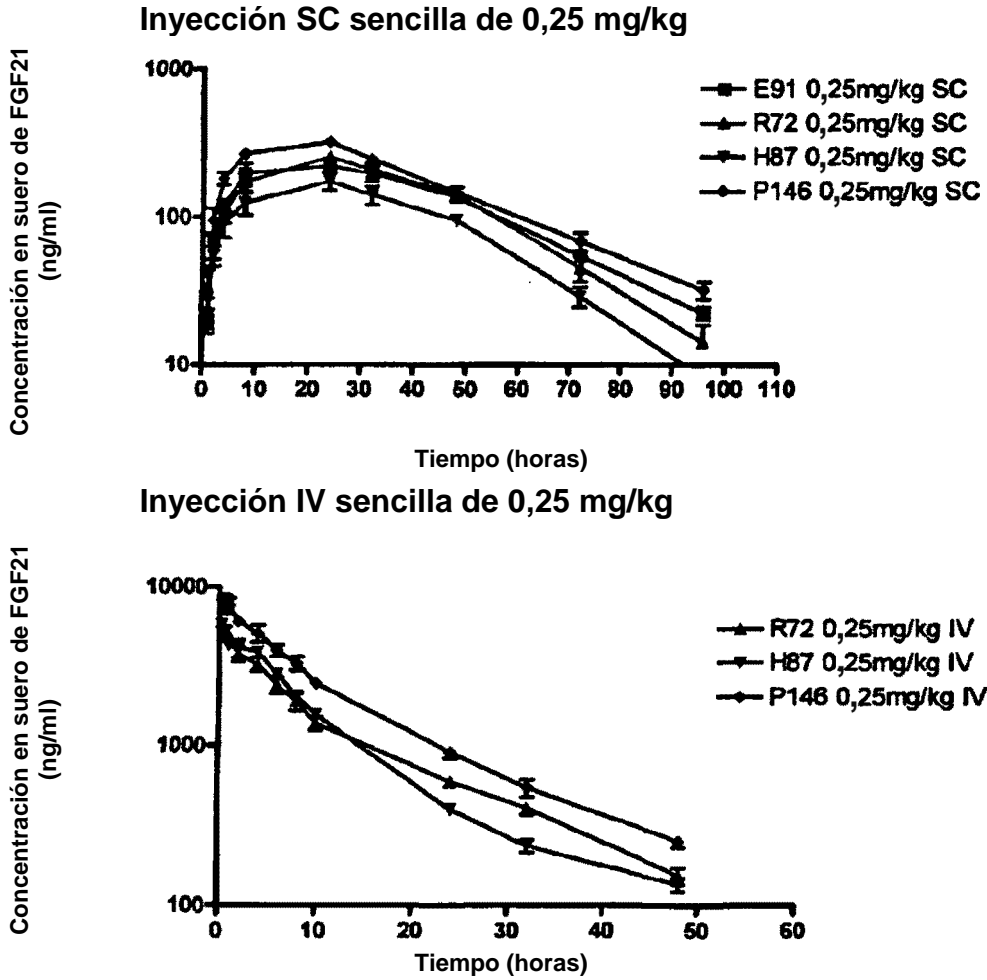


Figura 24

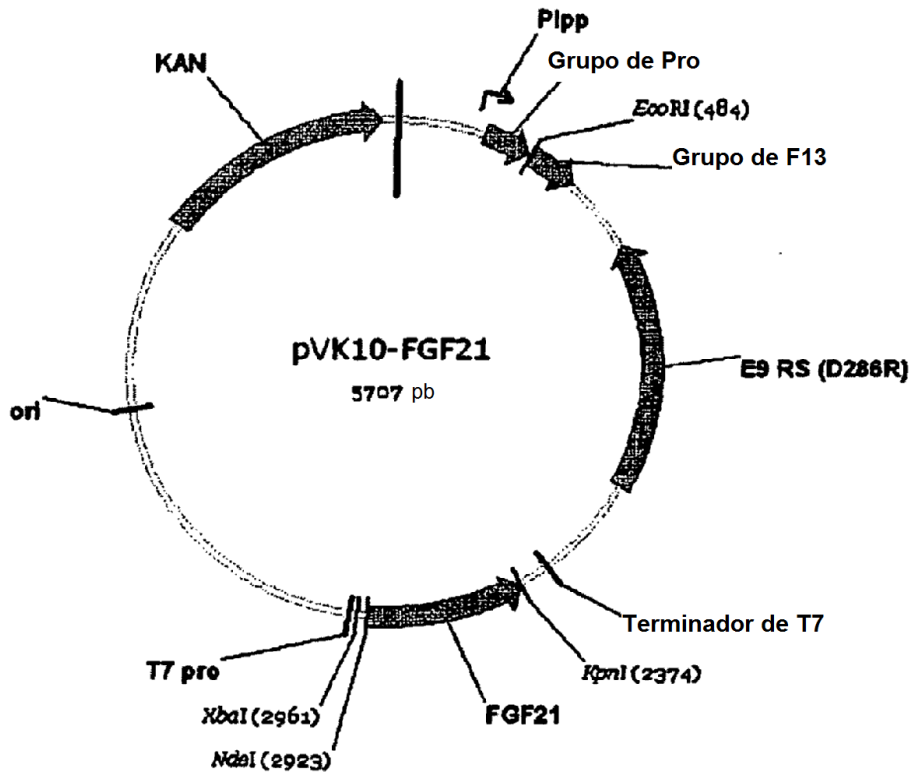


Figura 25

Secuencia de pVK10 FGF21

caaalagggttccgcccacattccccgaaagtgccacctgaaattgtaaacgacgctaagaaacattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgatcacaggcc
ctttctctcaagaattaccggggtaccaccggcagcgggtcggacgtgtgtaactcagaataagaatgaggccgctcatgctgctgctgctcttttggcgaacgac
aaaaataagtggccccatcaaaaaatatttcaacataaaaaactttgtgtaacttgtaacgctgaattggccctgggggtagccttgctatcctttggattgggatcct
gagaccagltcaaatcggggcagggccaccactctggtgaattggccctgggggtagcctggctatcctttggatttgggacccagttcaaatcggcag
gccccactctggtgaattccggcggtagttagcaggggcagaacggcggacttaaacccatggcgtgcttcaaatcagcccggaccactgagccactctg
tgccggcggtagttcagcagggcagaacggcgacttaaatccgactggcgttcaaacccagcccggaccactctccattatgggggaaaccgaaagtatata
atgagctgggagatccttagcgaagcctaaggattttlaagcttgcacalgtgcgaagcgaattaattcgcgaagaaaagcagaaaaaacggccggaacggcggctttg
gattgttgcgtttcttccggtatgaggcgtgaaccccttaacccggcctacaaaaagcagcaaacataatattgagagaicatgtaggctgataagcgtgacgcatcaggc
aattgagcttgaactgcagttataatcttcttaattggcttaaacctttataaagtctctagctacagcatitttaaccgattgtagcaatcctttatataaactctta
ctcctcatagctatnaactgtcaaatctcaacaaatttttggcctttttatggttaaaagattatcaaggaattatgctatctcattattgattcttcaacaacccagctggg
caglatgctttcttattgacctaaactctctgagagtcacaacagctataaaatccctttgagaactcaiccttctctcctcaaaacccgtaagacaggttggtaata
atagaaaaactatcgagcatcaaatgaaactgaaagttaalgcggtagttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcaccgtgtatgaaactcaaatgctctcaatg
aaactcagaacacttggatttctctctgtcttaagtccatctctctgtcttttaaggtagttttaagccaactatagacattcaggtataatccttatcaagccatg
ttacttccataaacatatttgccttaaccccaattgctcaaaaaactttttgataatctctattttctaatctcctcaactctctcttctggttaaaataggcgtgtaaacagccaaat
atataattalcaaatccagcatitgtlaaatcaaatctctttttatttggagataalgccataatgtatttaccacttggtaaaaaactaaacagcagattttcaicmmttaaac
ctcttaactcttctctgcgtataaattcagatggtttctctttatcttaaacattcgaattctcaaacgtaaaacacgtataaacggcgtatgcttataagcgggac
aggctgacaaccgaggatcttcaactcagcaaaagctgattatcaacaaagccgctgcccgaagtcagcgaatgctctgcccagtttacaacccaattcaactctg
atlagaaaaactatcgagcatcaaatgaaactgaaagttaalgcggtagttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcaccgtgtatgaaactcaaatgctctcaicgctc
atcctcggcaccgtcaccctggatgctgtagccataggcttggtatgctggtagctggcggctcttgggatccggatagcttctctcctttcagcaaaaaaccctcaaga
cccgttttagaggcccaagggtatgcttagtattgctagcggaggcagcacaactcagctctcttggggcttggtagcagcggtagtacctatagcgcgtaactaggga
gagcgaacttggtagcggactaccatcgacagaggalctgaactcggcagcttggagggttggggagccaataaccgggttggtaggttggctggggcaggccagc
agtggcagaaaaacggcgaccgcgcggggaggggicacgatgaggactttgtaaccaggcagatgagggcagaccgtggtctcactctgatacacatgtaaccatc
ttcagcagcagcttggcaaaaactcaagctcaaggatcaaaaatgcagcggccatatacagctgcccgcagcagcgttggcacaggaaacgactctcttaccggcaggaic
gaaagaccaccagcgtcagggctttagtgacgagtgacttggggatgacggcagcccctcgcagactcctcactcagcagatcctcaggtgagcctcagcttctgctg
atgctgggtgacaggaatctggcgcacctgaccacaatgtagtaaaaggagaagaaatcaggaatagggatgatalgtatctctcttaaaggtaaaacaaaatatttcta
gagggaaccctgttggctccctatagtgagctgtaataatctggggatcgagatcctggggcagcgttgggcttggccacggggtgcagatctgtctctgcttggg
accggctagctgicgggggtgcttactggttagcagaatgaatcaccgataagcagcgaactggaagcagctgctgcaaaactctgacacctgagcaacaactatg
aatggcttgcgttccgtgttctaaagcttggaaacggcgaagcagcggccttcaacattatgttccggatctgcatcgaggatgctgctgtaacctgtggaacactac
atctgattaaacgaagcgtgacattgaaccctgagttttcttggctcccggcaicacataccgccagttgtttaccctcaaacgttccagtaaccggcagatgtctacacag
taaccgtatctgagcatctctctgcttcaacggatcattaccctatgaaacagaatccccccttaacggaggcatcagtgacaaacaggaaaaaacggcccttaaacatg
ggccgcttcaagaagccagacattaacgctctggagaacacacagcgtggaagcagcggatgaacaggcagacatctgtaacgttcaagaccagcgtatgagctttac
cgagctcctcggcggcttggatgagcggtaaaacctcagacatgcagctccggagacgggtcacagcttctgtaagcggatgccgggagcagataaacccctc
aggcgcgctcagcgggttggcgggttgcggggcgagccaigaccagtcacgtagcgalagcggagtgatactggcttaaciatcggcaicagagcagattgactga
gagtgaccatatttgcgggtgtaaacccgacagatgctgaaggagaaaaataccgcatcagggcgtctctccgcttccctgctcactgactcgtcgtcgtcggctg
cggcgagcggatcagctactcaaaagcggtaaacggatccacaagaalacaggggataacgcaggaagaacatgtagcaaaaagccagcaaaaagccaggaacccg
taaaaagccggttctgctggcctttccatagcctcccccctgacgagcattcaaaaaatcagcgtcaagctcagagtgggcgaaccgcagcagactataaagatcc
aggcgtttccccctggaaagcctcctctgctgccttcttcttccgacctgcccgttaaccggataccctgccccttctccctcgggaagcgtggtccttctcaagctcagctg
taggtatctcagttcgggtgtagtctgctcacaagcigggtgtgtgcacgaaccccccgttccagcggacgctgccccttaccggtaactatccttggatgcaaacccggg
aagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaacaggatgacagagcagggatgtagggctcagagctcagagttctgaaagtggttggcctaactacgctacactag
aaggacagatttgatctgctcctgctgctgaaecagttactcctggaaaaagggttggtagctctgattccggcaaaacaaaccaccgtgtagcgggttttttggttgcaag
cagcagattacggcagaaaaaaaggatcaagaagatccttgaictttctacgggctgctgacgcctcagtggaacgaaaaactcagttaaaggatttggctatgaacaata
aacgtctctcaataaacagtaatacaagggtttagcctatcaacgggaacgctctgcttagcggcgaatlaaacatagatgctgattataggtataaa
tgggctcgcgataatgctgggcaatcaggtgcgacaactatcagttatgggaagcccgatgcccagaggtttctgaaacatgcaaaagtagcgttgccaatgatgttac
agatgagagtgtagactaaactggcgtgacggaaattatgccccttccgacctcaagcaattatcgtactcctgataigcatggttactcaccactcgtatccccgggaaaaac
agcattccaggtattagaagaalactgtatcagggtgaaaaattggtatgctcgtggcaggttctcgtcccgggttcaicgattcctgtttgtaattgcttttaaacgcgacg
gtattctgctcagcggcgaalcacgaatgaalacgggttgggtgagcgagatgattttgacgagcgtaatggcctgctgttgaacaactgctgaaagaaatgcataaa
ctttgccattctcaccgattcagctgctcactcatggtatttctactgataaccttaattttgacaggggaaataataggtgtattgatttggacgagctggaaicgcagacc
gataccaggaicctccatggaacgtcccggtagtttctctcattacagaaacggcttttcaaaaataggtattgataaactgatalgaataaattgcaattctattga
tgcctgatgattttcaagaataattcatgagcggatataatttgaattattagaaaaataaa

Figura 26

Evaluación farmacocinética de FGF21 marcado con N-His 6 de tipo silvestre (WT)

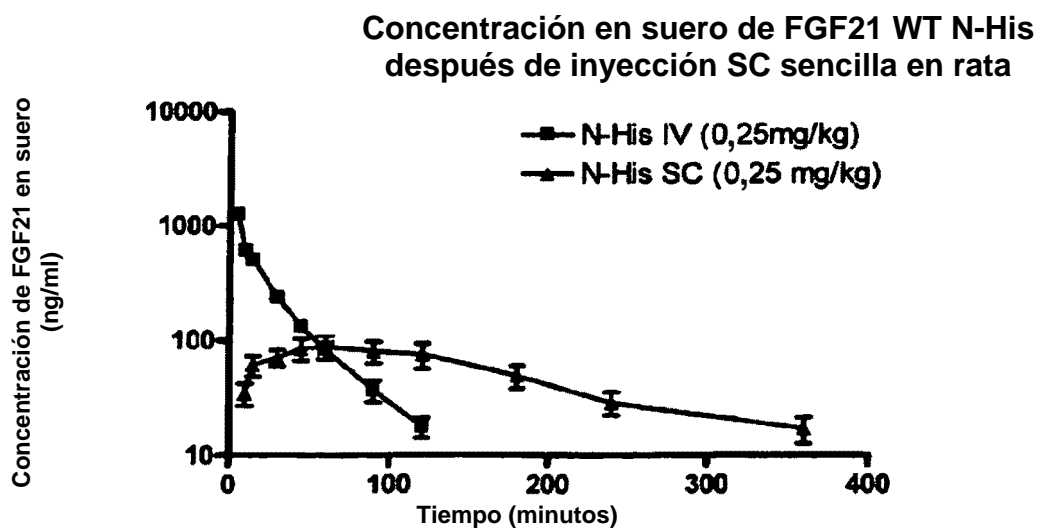
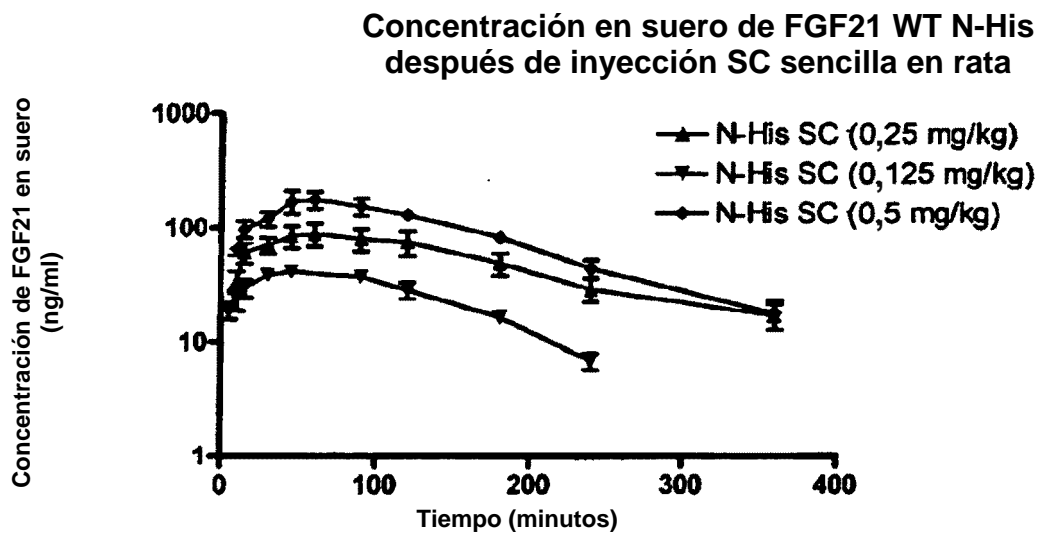


Figura 27

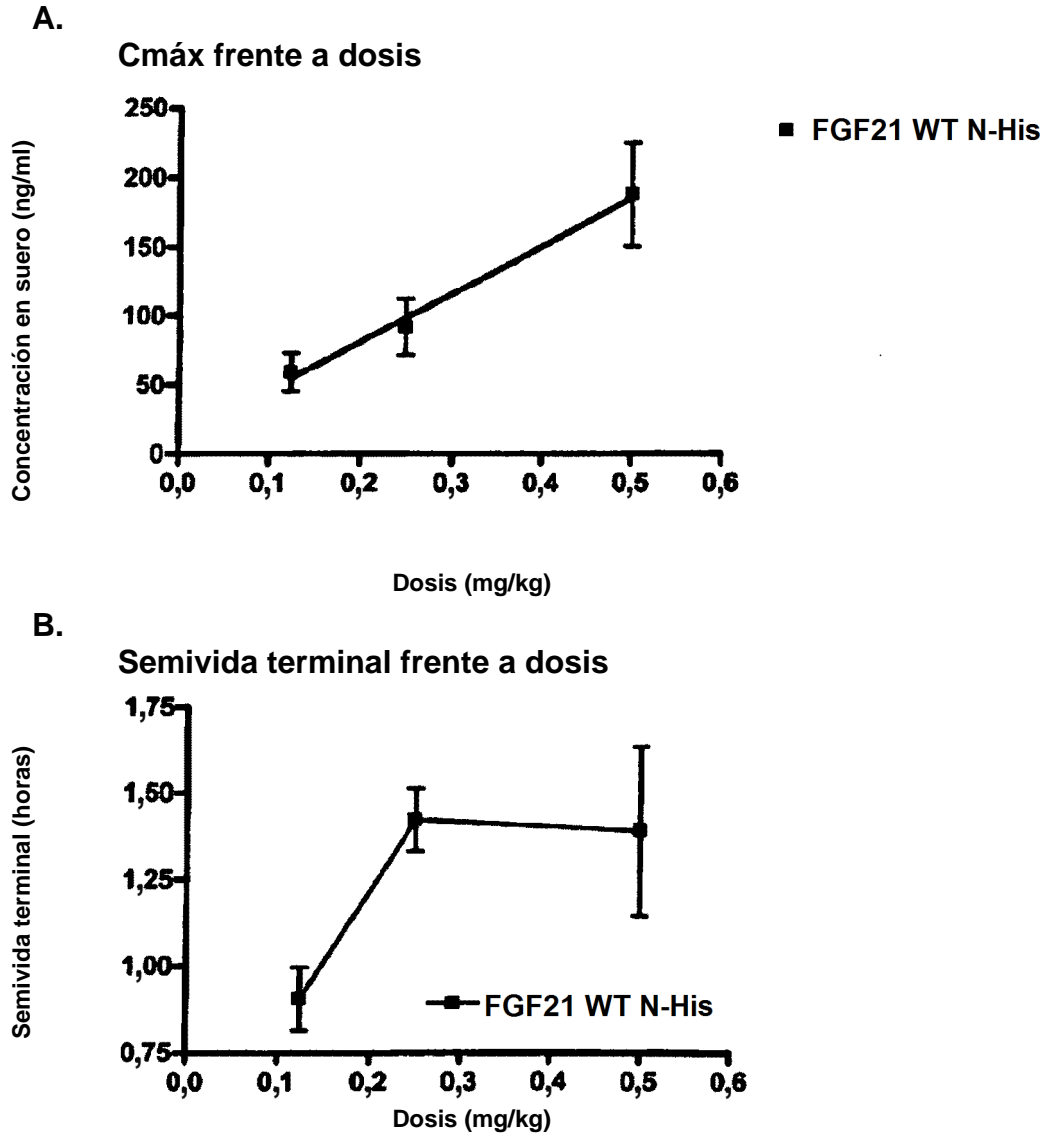


Figura 27 (continuación)

C.

Concentración en suero. Tiempo frente a dosis

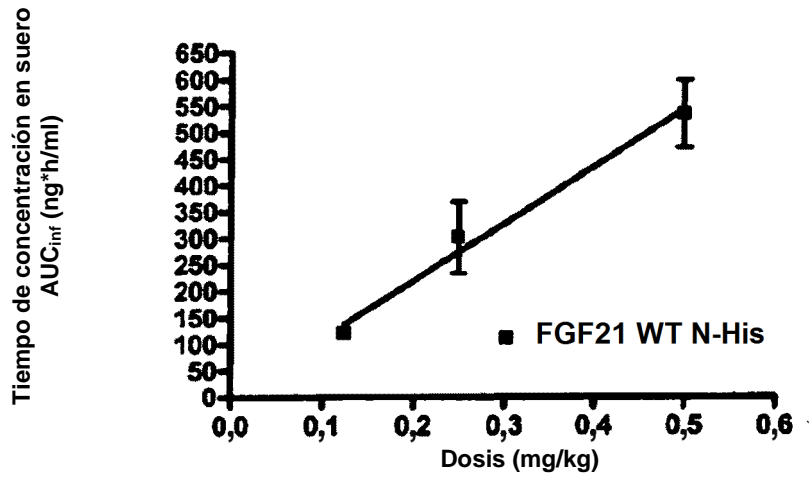


Figura 28

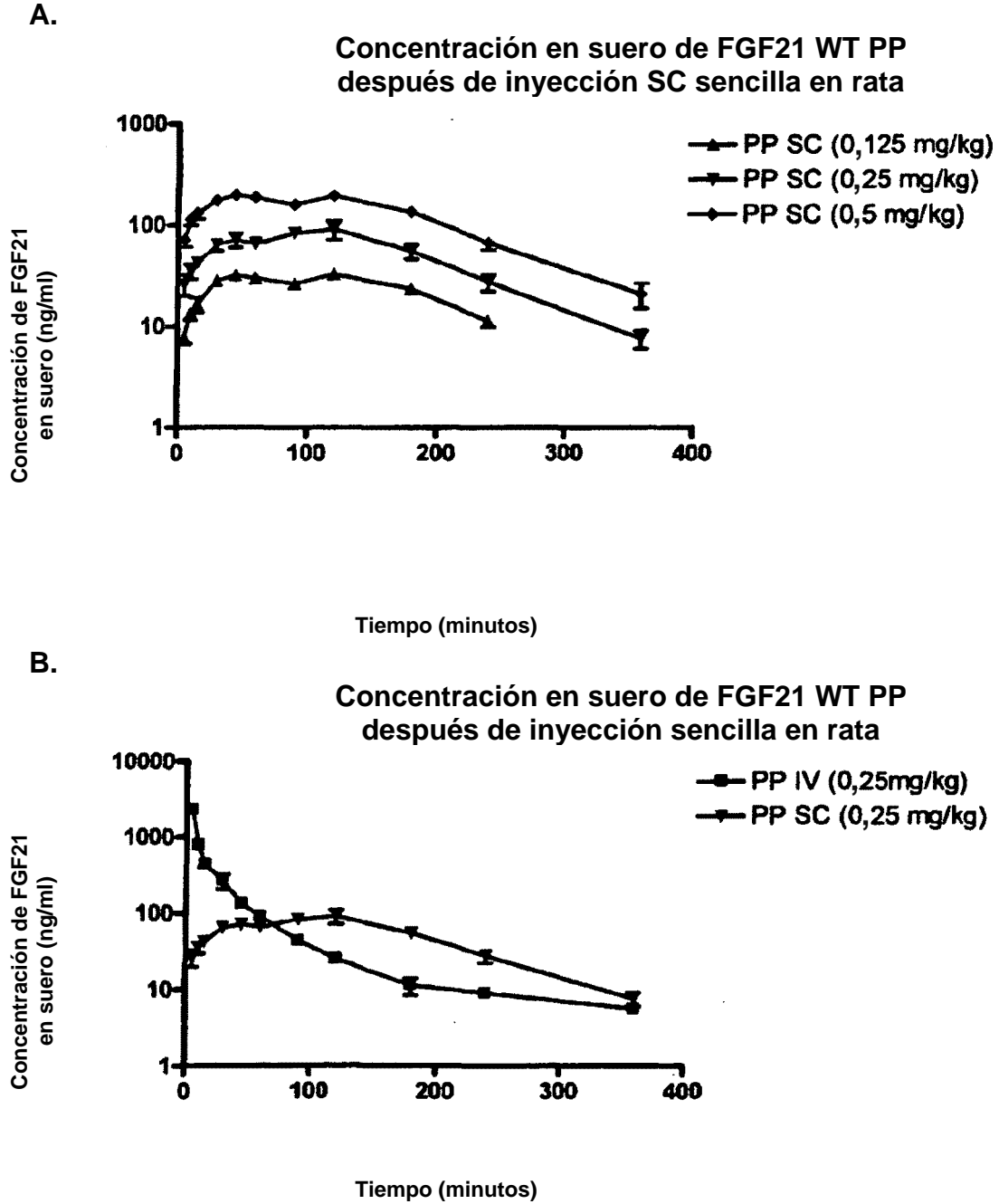


Figura 29

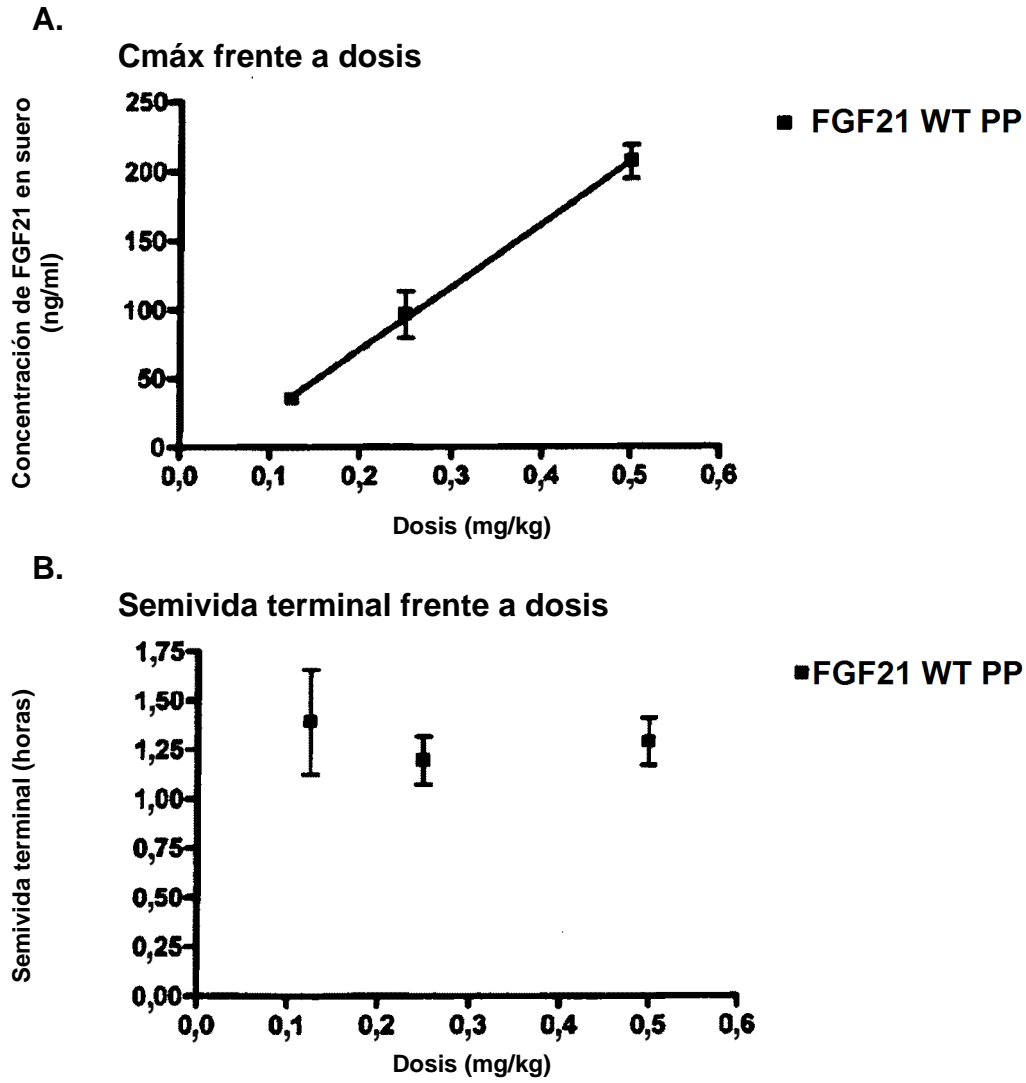


Figura 29 (continuación)

C.

AUC frente a dosis

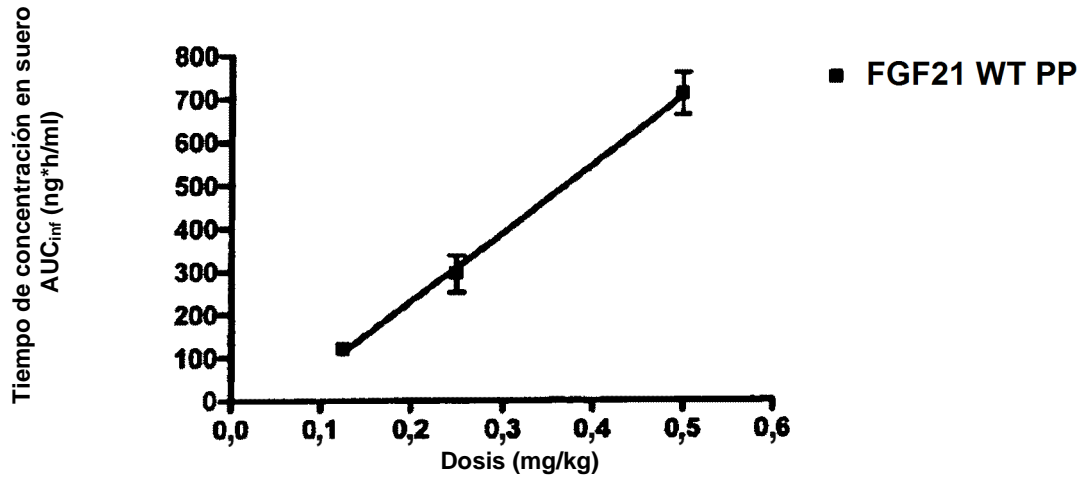


Figura 30

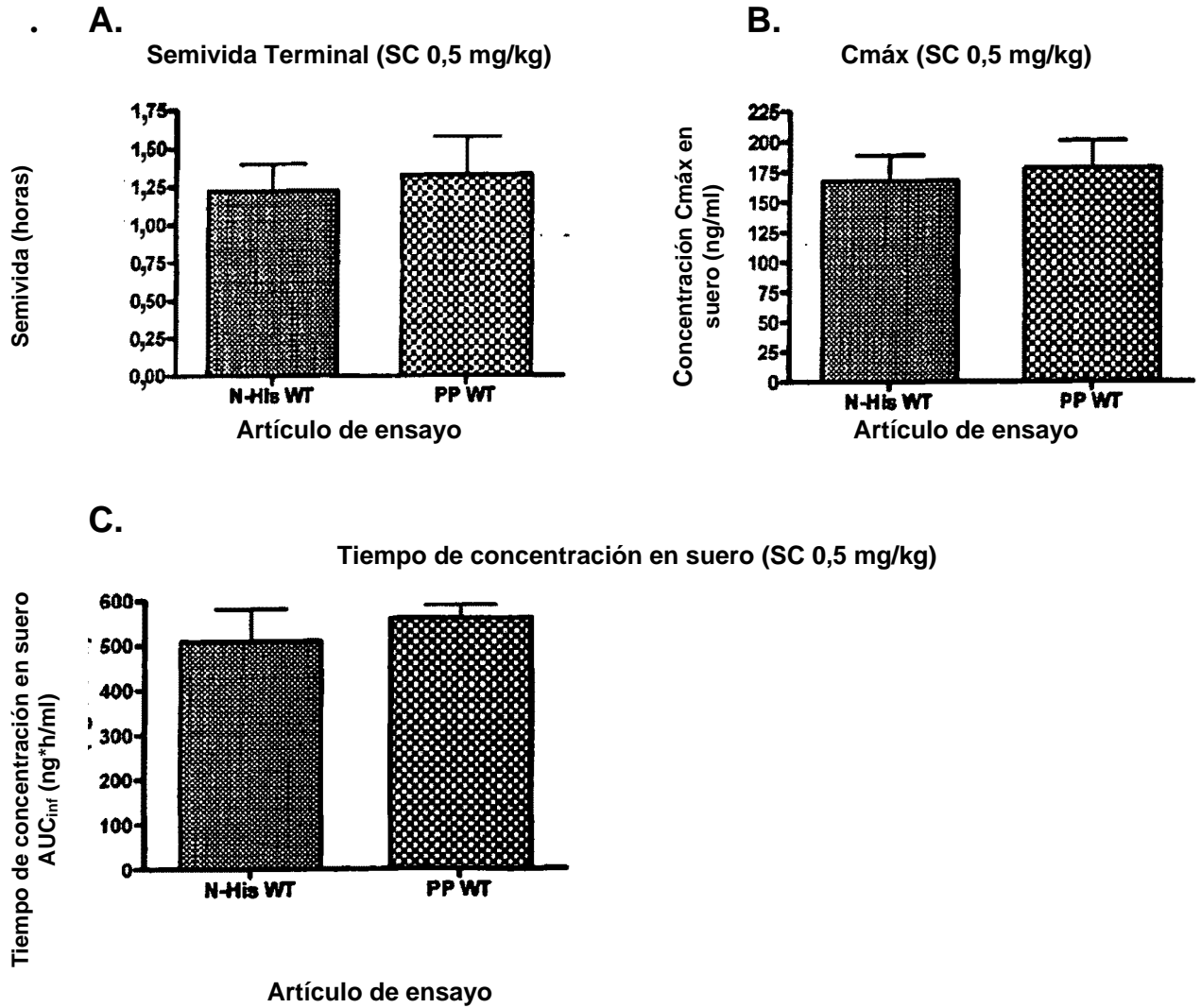


Figura 31

A.

Análisis PK de rata de isómeros de FGF21

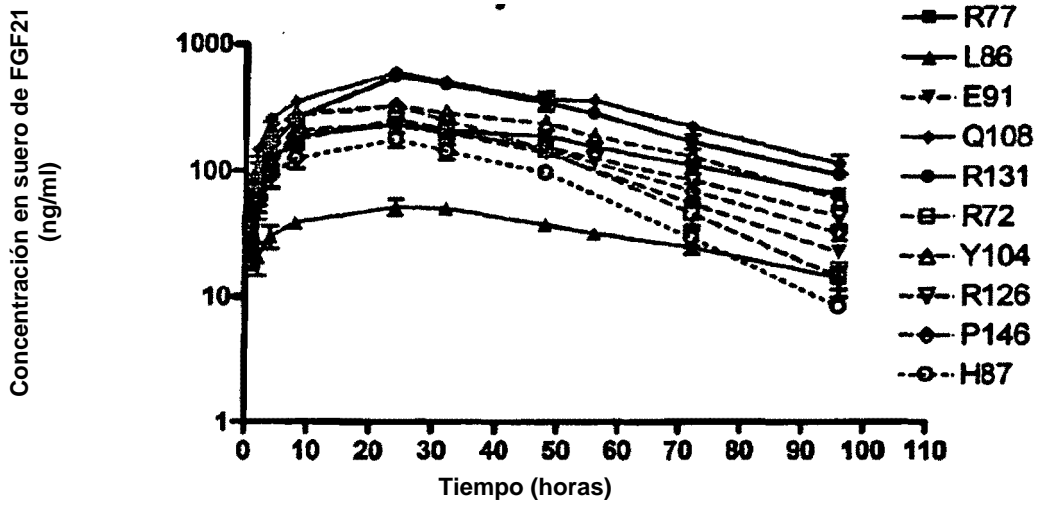


Figura 31 (continuación)

B.

Análisis PK de rata de isómeros de FGF21
(absorción)

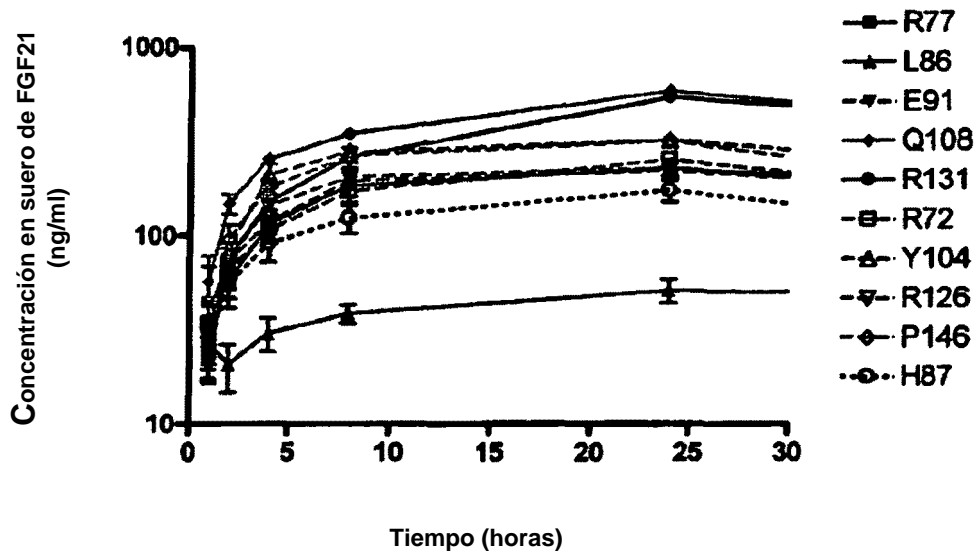


Figura 31 (continuación)

C.

Análisis PK de rata de isómeros de FGF21

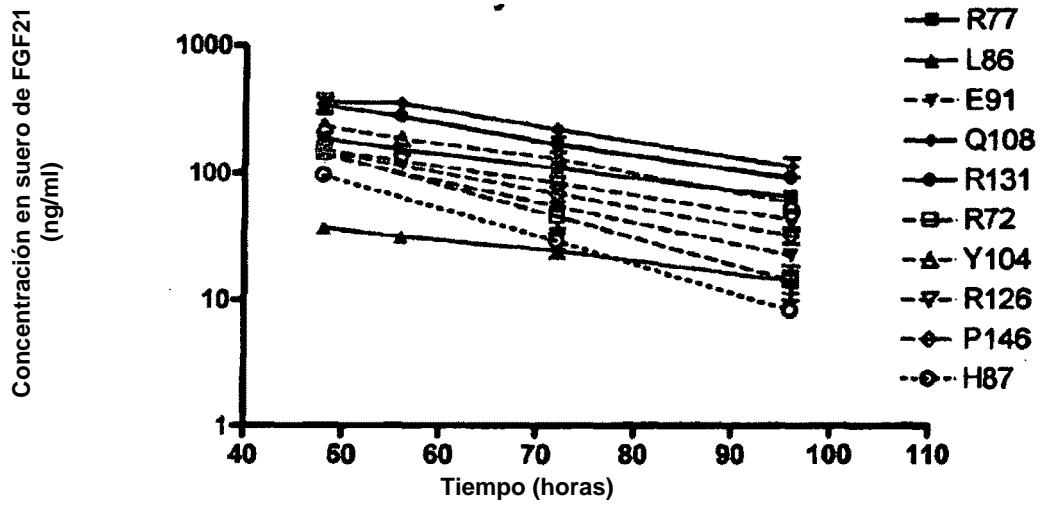


Figura 32

Concentración en suero de FGF21 N6-His después de inyección SC sencilla en rata

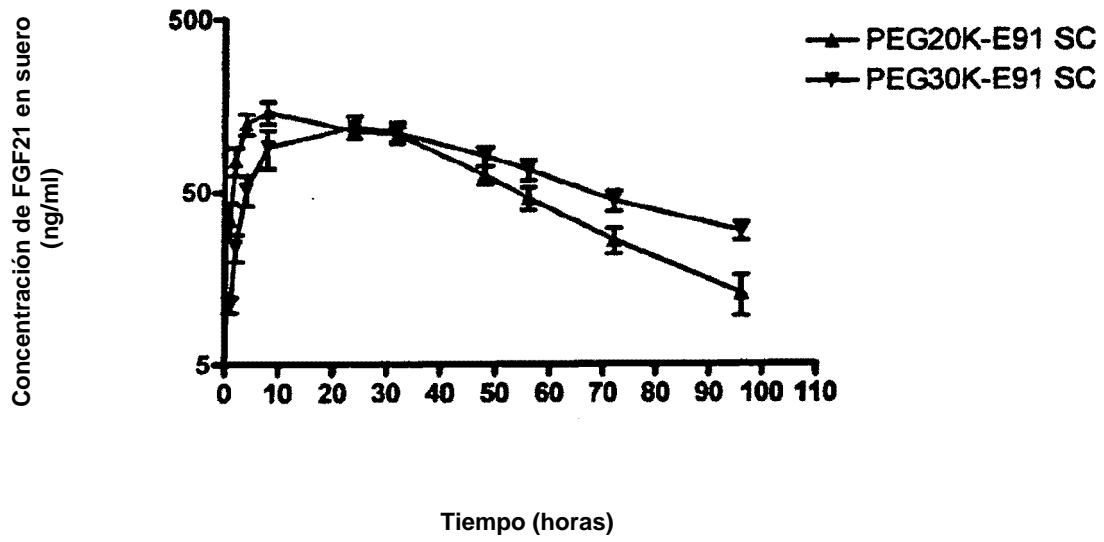


Figura 33

**Concentración en suero de FGF21 WT N-His
después de inyección sencilla en rata**

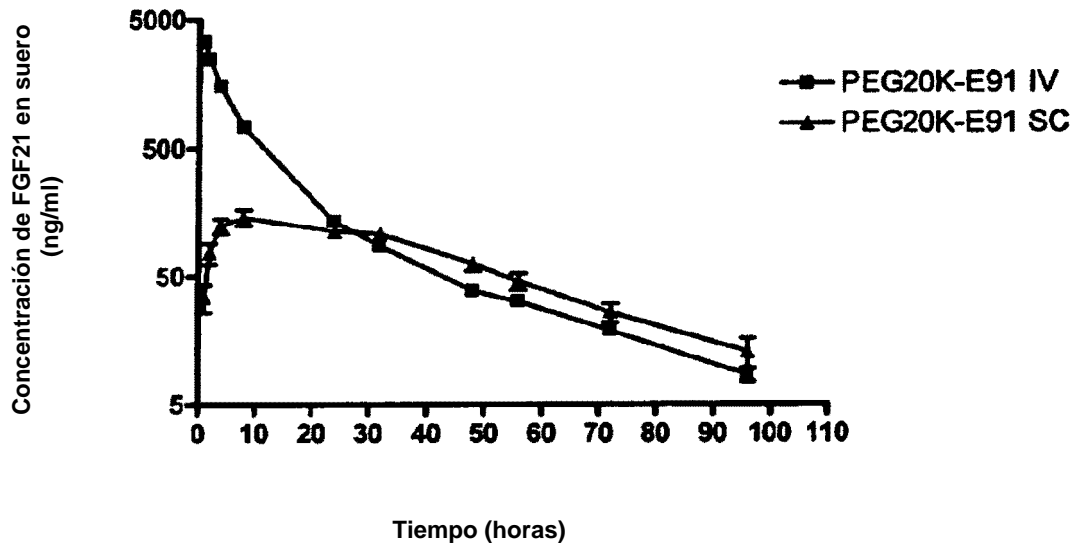


Figura 34

Secreción de FGF21 en *E. coli*

