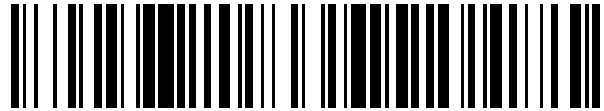


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 670**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2005 E 12155003 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 2586456**

54 Título: **Remodelación y glucopegilación del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)**

30 Prioridad:

29.10.2004 US 623342 P

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

14.04.2016

73 Titular/es:

**RATIOPHARM GMBH (100.0%)
Graf-Arco-Strasse 3
89079 Ulm, DE**

72 Inventor/es:

DEFREES, SHAWN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 566 670 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

Remodelación y glucopegilación del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud está relacionada con la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 60/623,342, presentada el 29 de octubre del 2004.

Antecedentes de la invención

10 Los Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF, siglas de *Fibroblast Growth Factors*) promueven el crecimiento, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de una amplia variedad de tipos de células y tejidos. Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) prototipo, FGF-1 y FGF-2, se aislaron originalmente de cerebro y pituitaria como mitógenos para fibroblastos. Sin embargo, FGF-1 y FGF-2, y en general, los factores de crecimiento de fibroblastos, se expresan ampliamente en tejidos adultos y en desarrollo, y tienen múltiples actividades biológicas, entre las que se incluye la angiogénesis, la mitogénesis, la diferenciación celular y la reparación de lesiones tisulares (véase, por ejemplo, Baird, A. y col., *Cancer Cells* 3: 239-243 (1991) y Burgess, W. H. y col., *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606 (1989)).

15 Según la bibliografía publicada, la familia de FGF consiste ahora en al menos veinticinco miembros, FGF-1 a FGF-25. La masa molecular de los 25 miembros de la familia de FGF varía de 17 a 34 kDa y comparten una identidad de aminoácidos de 13-71 %. Entre las especies de vertebrados, los FGF están muy conservados tanto en cuanto a la estructura génica como a la secuencia de aminoácidos.

20 Los 25 miembros de la familia de FGF de mamíferos se expresan diferencialmente en muchos tejidos. Los miembros se dividen en subfamilias que tienen patrones de expresión similares, aunque individualmente exclusivos. Algunos FGF se expresan exclusivamente durante el desarrollo embrionario (por ejemplo, *Fgf3*, 4, 8, 15, 17 y 19), mientras que otros se expresan en tejidos embrionarios y adultos. Por ejemplo, el ARNm de *FGF-16* se expresa predominantemente en el corazón de rata en tejidos adultos. Sin embargo, en embriones de rata, el ARNm de *FGF-16* se expresa predominantemente en el tejido adiposo marrón (véase, por ejemplo, Miyake A, y col. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 243: 148-152).

25 Aunque la mayoría de los FGF (FGF 3-8, 10, 15, 17-19 y 21-25) tienen péptidos señal amino terminales y las células los secretan fácilmente, los FGF 9, 16 y 20 carecen de un péptido señal amino terminal obvio pero no obstante se secretan (véase, por ejemplo, Miyamoto M, y col. *Mol Cell Biol* 1993, 13: 4251-4259). Un tercer subconjunto de FGF (FGF 11-14) carece de secuencias señal y se piensa que continúan siendo intracelulares.

30 Como se ha indicado anteriormente, la subfamilia de proteínas FGF que comprende FGF-9, FGF-16 y FGF-20 carece de una secuencia señal clásica, aunque contiene señales de localización nuclear y se secretan. Estos FGF se expresan en el sistema nervioso en desarrollo y en adultos, lo que sugiere un papel en el desarrollo y función del sistema nervioso (véase por ejemplo, Smallwood P. M., y col. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93: 9850-9857). De hecho, un ADNc que codifica FGF-20 se aisló de cerebro de rata (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.797.695). Entre los miembros de la familia de FGF, el FGF-20 es el más similar a FGF-9 y FGF-16 (con una identidad de aminoácidos de 70 y 62 %, respectivamente).

35 Numerosos estudios de trastornos humanos, así como estudios de desactivación de genes (*gene knock-out*) en ratones indican que los FGF son neurotróficos para las células tanto del sistema nervioso central como periférico y son importantes en el desarrollo del sistema esquelético en mamíferos. Se confirma un papel en el desarrollo y función del sistema nervioso mediante estudios de hibridación *in situ* que muestran que el ARNm de FGF-20 se expresan preferiblemente en la parte compacta de la sustancia negra del cerebro. Una confirmación adicional para una función del sistema nervioso se descubrió en estudios *in vitro* que mostraban que el FGF-20 recombinante de rata potenciaba la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en cultivo (véase, por ejemplo, Ohmachi S. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 277: 355-360).

45 En otros estudios, se ha mostrado que se producen altos niveles de expresión del ARNm de FGF-21 en el hígado, y que el FGF-21 humano desempeña un papel en el desarrollo y en la recuperación de enfermedad hepática. El FGF-21 también se expresa en testículo y timo, y por lo tanto puede desempeñar un papel en el desarrollo o recuperación de trastornos de la función testicular o función de células derivadas de timo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.716.626).

50 Debido a su gran alcance y fuerte actividad, los FGF son interesantes como agentes terapéuticos para diversas manifestaciones diferentes, entre las que se incluyen, la curación de heridas, tales como afecciones músculo esqueléticas, fracturas de hueso, reparación de ligamentos y tejidos, tendinitis, bursitis, etc.; afecciones cutáneas, por ejemplo, quemaduras, cortes, laceraciones, escaras, úlceras de lenta curación, etc.; protección y reparación de tejidos, y la inducción de la angiogénesis durante un infarto de miocardio e isquemia, afecciones y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, inflamación intestinal, incluyendo, enfermedad intestinal inflamatoria, véase, por ejemplo, Jeffers y col. *Gastroenterology* 2002,123: 1151-1162), en el tratamiento de afecciones neurológicas, tales como

enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Parkinson) e ictus, en el tratamiento de enfermedades oculares, entre las que se incluye, degeneración macular, la patología y el tratamiento del cáncer (véase, por ejemplo, Jeffers, M., y *col.* *Cancer Research* 61, 3131-3138, 1 de abril, (2001) y Jeffers y *col.* *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (2002) 6(4): 469-482) y para el tratamiento de la diabetes. Por desgracia, la administración de proteínas terapéuticas, tales como FGF-9, FGF-18, FGF-20 y FGF-21 para el tratamiento de enfermedades y afecciones puede complicarse, por ejemplo, debido a su corta semivida y a propiedades mutagénicas.

El poli(etilenglicol) ("PEG") es un ejemplo de un polímero que se ha conjugado con polipéptidos. Se demostrado que el uso de PEG para derivatizar péptidos terapéuticos reduce la inmunogenicidad de los péptidos y mejora las propiedades farmacodinámicas, incluyendo la semivida. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.179.337 (Davis y *col.*) se refiere a polipéptidos no inmunogénicos, tales como enzimas y hormonas peptídicas acopladas a polietilenglicol (PEG) o a polipropilenglicol. Se usan entre 10 y 100 moles de polímero por mol de polipéptido y al menos se conserva el 15 % de la actividad fisiológica. Además, se prolonga el tiempo de eliminación en circulación debido al mayor tamaño del PEG conjugado con los polipéptidos en cuestión. Los procedimientos descritos por Davis y *col.* Son procedimientos químicos de PEGilación.

La modificación química de los péptidos, frecuentemente produce una pérdida de actividad peptídica no deseable, que puede atribuirse a la naturaleza no selectiva de los compuestos químicos utilizados para modificar el péptido. Por ejemplo, cuando el grupo modificador es un péptido soluble en agua, por ejemplo, PEG, el modo de unión principal del PEG, y sus derivados, con péptidos es un enlace inespecífico a través de un resto de aminoácido peptídico. Los estudios de conjugados de polímeros solubles en agua y de interleucina-2 (Fisher y *col.*, *Br. J. Haematol.*, 82: 654 (1992)), del factor estimulante de colonias de granulocitos (Satake-Ishikawa y *col.*, *Cell Struct. Funct.*, 17: 157 (1992)), del factor de necrosis tumoral (Tsutsumi y *col.*, *Br. J. Cancer*, 71: 963 (1996)) y del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (Clark, y *col.*, *J. Biol. Chem.*, 271: 21969 (1996)) han revelado que la PEGilación química de estas proteínas disminuye *in vivo* la actividad de unión de los péptidos con receptores.

En muchos procedimientos de PEGilación química, el poli(etilenglicol) se añade esencialmente al azar, de manera inespecífica, a restos reactivos sobre un esqueleto peptídico. Para la producción de péptidos terapéuticos, es claramente deseable utilizar una estrategia de derivatización que produzca la formación de un producto específicamente marcado, fácilmente caracterizable, esencialmente homogéneo. Una ruta prometedora para producir específicamente péptidos marcados es usando enzimas, tales como glucosiltransferasas para agregar un residuo de azúcar modificado a un péptido.

La síntesis basada en enzimas tiene las ventajas de regioselectividad y estereoselectividad. Además, la síntesis enzimática se realiza usando sustratos no protegidos. En la síntesis de hidratos de carbono, se usan dos clases principales de enzimas, las glucosiltransferasas (por ejemplo, sialiltransferasas, oligosacariltransferasas, *N*-acetilglucosaminiltransferasas) y las glucosidasas. Estas últimas se clasifican adicionalmente en exoglucosidasas (por ejemplo, β -manosidasa, β -glucosidasa) y endoglucosidasas (por ejemplo, Endo-A, Endo-M). Cada una de estas clases de enzimas se ha usado satisfactoriamente para producir sintéticamente hidratos de carbono. Para una revisión general, véase, Crout y *col.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 98-111 (1998).

Las glucosiltransferasas modifican las estructuras de los oligosacáridos sobre glucopéptidos, produciendo productos específicos con buen control estereoquímico y regioquímico. Las glucosiltransferasas se usan para producir oligosacáridos y para modificar estructuras de hidratos de carbono terminales unidos a N y unidos a O, particularmente en glucopéptidos producidos en células de mamífero. Por ejemplo, los oligosacáridos terminales de los glucopéptidos se han sialilado y/o fucosilado completamente para proporcionar estructuras de azúcar más consistentes, que mejoran las propiedades farmacodinámicas y otras diversas propiedades biológicas de los glucopéptidos. Por ejemplo, se usa β -1,4-galactosiltransferasa para sintetizar lactosamina, una ilustración de la utilidad de las glucosiltransferasas es la síntesis de hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Wong y *col.*, *J. Org. Chem.* 47: 5416-5418 (1982)). Además, numerosos procedimientos de síntesis han hecho uso de α -sialiltransferasas para transferir ácido siálico del ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico al 3-OH o 6-OH de la galactosa (véase, por ejemplo, Kevin y *col.*, *Chem. Eur. J.* 2: 1359-1362 (1996)). Se usan fucosiltransferasas en rutas de síntesis para transferir una unidad de fucosa desde la guanosina-5'-difosfocucosa a un hidroxilo específico de un aceptor de sacárido. Por ejemplo, Ichikawa preparó sialil Lewis-X mediante un procedimiento que implicaba la fucosilación de la lactosamina sialilada con una fucosiltransferasa clonada (Ichikawa y *col.*, *J. Am. Chem. Soc.* 114: 9283-9298 (1992)). Para un análisis de recientes avances en la síntesis de glucoconjugados para su uso terapéutico véase Koeller y *col.*, *Nature Biotechnology* 18: 835-841 (2000). Véanse también las Patentes de Estados Unidos n.º 5.876.980; 6.030.815; 5.728.554; 5.922.577 y el documento WO/9831826.

Las glucosidasas también pueden usarse para producir sacáridos. Normalmente, las glucosidasas catalizan la hidrólisis de un enlace glucosídico. Sin embargo, en condiciones apropiadas, pueden usarse para formar este enlace. La mayoría de las glucosidasas que se usan para la síntesis de hidratos de carbono son exoglucosidasas; la transferencia de glucosilo se produce en el extremo no reductor del sustrato. La glucosidasa se absorbe a un donante de glucosilo en un producto intermedio de glucosilo-enzima que es interceptado por agua para dar el producto de hidrólisis, o por un aceptor, para dar un nuevo glucósido u oligosacárido. Un ejemplo de una ruta que usa una exoglucosidasa es la síntesis del trisacárido central de todos los glucopéptidos unidos a N, incluyendo el

difícil enlace de β -manósido, que se forma por la acción de la β -manosidasa (Singh y *col.*, Chem. Commun. 993-994 (1996)).

En otra aplicación a modo de ejemplo del uso de una glucosidasa para formar un enlace glucosídico, se ha preparado una glucosidasa mutante donde el aminoácido nucleófilo normal, dentro del sitio activo, se cambia por un aminoácido no nucleófilo. La enzima mutante no hidroliza enlaces glucosídicos, pero aún puede formarlos. Las glucosidasas mutantes se usan para producir oligosacáridos usando un donante de flúor α -glucosilo y una molécula aceptora de glucósido (Withers y *col.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.716.812). Aunque las glucosidasas mutantes son útiles para la formación de oligosacáridos libres, aún no se ha demostrado que dichas enzimas puedan agregar donantes de glucosilo en péptidos glucosilados o no glucosilados, ni que estas enzimas se hayan usado con donantes de glucosilo inactivados.

Aunque su uso es menos habitual que el de las exoglucosidasas, las endoglucosidasas también se utilizan para producir hidratos de carbono. Los procedimientos basados en el uso de endoglucosidasas tienen la ventaja de que se transfiere un oligosacárido en lugar de un monosacárido. Los fragmentos de oligosacárido se han añadido a sustratos usando *endo*- β -N-acetilglucosaminas tales como *endo*-F, *endo*-M (Wang y *col.*, Tetrahedron Lett: 37: 1975-1978); y Haneda y *col.*, Carbohydr. Res. 292: 61-70 (1996)).

Además de su uso en la preparación de hidratos de carbono, las enzimas comentadas anteriormente también se aplican a la síntesis de glucopéptidos. Se ha publicado la síntesis de una glucoforma homogénea de ribonucleasa B (Witte K. y *col.*, J. Am. Chem. Soc. 119: 2114-2118 (1997)). El núcleo de manosa superior de la ribonucleasa B se escindió tratando el glucopéptido con endoglucosidasa H. La escisión se produjo específicamente entre los dos restos de GlcNAc centrales. Después, el tetrasacárido sialil-Lewis X se reconstruyó enzimáticamente en el sitio de anclaje de GlcNAc restante en la ahora proteína homogénea mediante el uso secuencial de β -1,4-galactosiltransferasa, α -2,3-sialiltransferasa y α -1,3-fucosiltransferasa V. Cada etapa catalizada enzimáticamente avanzó con un rendimiento excelente.

En la técnica también se conocen procedimientos que combinan elementos sintéticos tanto químicos como enzimáticos. Por ejemplo, Yamamoto y colaboradores (Carbohydr. Res. 305: 415-422 (1998)) informaron de la síntesis quimioenzimática del glucopéptido, Péptido T glucosilado, usando una endoglucosidasa. El péptido N-acetilglucosaminilo se sintetizó por medios puramente químicos. Después, el péptido se elaboró enzimáticamente con el oligosacárido del glucopéptido de transferrina humana. La porción sacárida se añadió al péptido tratándolo con una *endo*- β -N-acetilglucosaminidasa. El péptido glucosilado resultante fue muy sensible y resistente a la proteólisis cuando se comparó con el péptido T y con el N-acetilglucosaminil péptido T.

El uso de glucosiltransferasas para modificar la estructura de los péptidos se ha explorado con grupos indicadores. Por ejemplo, Brossmer y *col.* (Patente de Estados Unidos n.º 5.405.753) describen la formación de un monofosfato de citidina ("CMP") marcado con fluorescencia derivado de ácido siálico y el uso del glucósido fluorescente en un ensayo de actividad de la sialil transferasa y para el marcado con fluorescencia de superficies celulares, glucoproteínas y gangliósidos. Gross y *col.* (Analyt. Biochem. 186: 127 (1990)) describen un ensayo similar. Bean y *col.* (Patente de Estados Unidos n.º 5.432.059) describen un ensayo para trastornos del déficit de la glucosilación utilizando la reglucosilación de una proteína deficientemente glucosilada. La proteína deficiente se reglucosila con un glucósido de CMP marcado con fluorescencia. Cada uno de los derivados de ácido siálico fluorescentes está sustituido con el residuo fluorescente bien en la posición 9 o en la amina que normalmente está acetilada en ácido siálico. Los procedimientos que usan los derivados de ácido siálico fluorescentes son ensayos para detectar la presencia de glucosiltransferasas o de glucoproteínas no glucosiladas o inapropiadamente glucosiladas. Los ensayos se realizan en pequeñas cantidades de enzima o glucoproteína en una muestra de origen biológico. En ninguna de estas referencias bibliográficas se ha descrito o sugerido la derivatización enzimática de un péptido glucosilado o no glucosilado a una escala preparativa o industrial usando un ácido siálico modificado.

También se han usado procedimientos enzimáticos para activar restos de glucosilo en un glucopéptido para una elaboración química posterior. Los restos de glucosilo se activan típicamente usando galactosa oxidasa, que transforma un resto de galactosa terminal en el aldehído correspondiente. El aldehído se acopla posteriormente a un grupo modificador que contiene amina. Por ejemplo, Casares y *col.* (Nature Biotech. 19: 142 (2001)) han unido doxorubicina a los restos de galactosa oxidados de una quimera de MHCII-péptido recombinante.

También se han modificado restos de glucosilo para que contengan grupos de cetona. Por ejemplo, Mahal y colaboradores (Science 276: 1125 (1997)) han preparado N-levulinoil manosamina ("ManLev"), que tiene una funcionalidad cetona en la posición normalmente ocupada por el grupo acetilo en el sustrato natural. Se trataron células con ManLev, incorporando así un grupo de cetona en la superficie celular. Véanse también Saxon y *col.*, Science 287: 2007 (2000); Hang y *col.*, J. Am. Chem. Soc. 123: 1242 (2001); Yarema y *col.*, J. Biol. Chem. 273: 31168 (1998); y Charter y *col.*, Glycobiology 10: 1049 (2000).

Los hidratos de carbono se unen a glucopéptidos de diversas maneras, siendo las más importantes para los productos terapéuticos de glucoproteínas recombinantes, los glucopéptidos unidos a N con asparagina y los unidos a O con serina y treonina de tipo mucina. Un factor determinante para el inicio de la glucosilación de una proteína es el contexto de secuencia primaria, aunque claramente otros factores, entre los que se incluyen la región y

conformación de la proteína, desempeñan funciones. La glucosilación unida a N se produce en la secuencia consenso NXS/T, en la X puede ser cualquier aminoácido salvo prolina.

La presente invención responde a estas necesidades proporcionando mutantes de FGF que contienen sitios de glucosilación unidos a N o unidos a O recién introducidos, proporcionando flexibilidad en la glucosilación y/o glucopegilación de estos mutantes de FGF recombinantes. Además, la invención proporciona un procedimiento práctico, desde el punto de vista industrial, para la modificación de péptidos FGF mutantes unidos a N o unidos a O con grupos modificadores, tales como polímeros solubles en agua, residuos terapéuticos, biomoléculas y similares. De particular interés son los procedimientos en los que el FGF mutante modificado tiene propiedades mejoradas, lo que potencia su uso como un agente terapéutico o de diagnóstico.

10 Breve compendio de la invención

Se ha descubierto ahora que la modificación controlada del Factor de Crecimiento de Fibroblastos con uno o más grupos modificadores (por ejemplo, con grupos modificadores no glucosídicos) ofrece un nuevo conjugado peptídico de FGF con propiedades farmacocinéticas que están mejoradas con respecto al FGF correspondiente natural (no modificado). Además, también se han descubierto y desarrollado procedimientos rentables para la producción fiable y reproducible de los conjugados peptídicos de FGF de la invención.

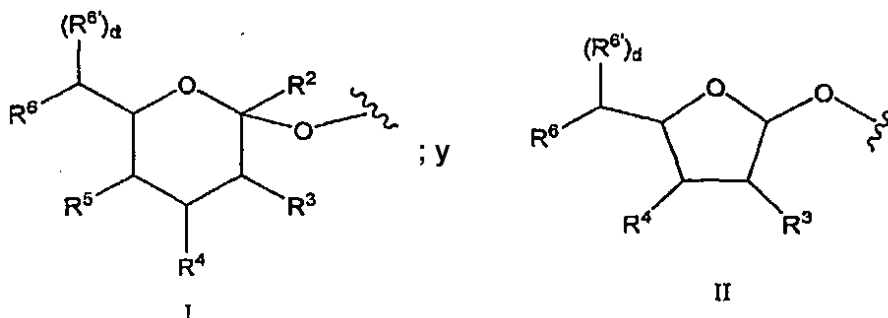
En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de FGF que comprende un péptido de FGF y un casete de poli(etilenglicol)-grupo de unión a glucosilo unido a un resto de aminoácido del péptido de FGF.

En una realización ejemplar, las moléculas de FGF glucoconjugadas de la invención se producen mediante la formación, a través de la mediación de enzimas, de un conjugado entre un péptido de FGF glucosilado o no glucosilado y un residuo de sacarilo enzimáticamente transferible que incluye un grupo modificador, tal como un grupo modificador polimérico, por ejemplo, poli(etilenglicol), en su estructura. El grupo modificador está unido al residuo de sacarilo directamente (es decir, a través de un solo grupo formado por la reacción de dos grupos reactivos) o a través de un residuo enlazador, por ejemplo, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, etc.

En un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un residuo de PEG y un péptido que tiene una actividad *in vivo* similar o de otra manera análoga a la del FGF reconocido en la técnica. En el conjugado de la invención, el residuo de PEG está unido de manera covalente al péptido mediante un grupo de enlace glucosilo o un grupo de enlace glucosilo intacto. Los ejemplos de grupos de enlace glucosilo intactos incluyen residuos de ácido siálico que están derivatizados con PEG.

El residuo de sacarilo que porta el grupo modificador polimérico puede unirse a cualquier posición de un residuo de glucosilo de FGF. Además, el grupo modificador polimérico puede estar unido a un residuo de glucosilo en cualquier posición en la secuencia de aminoácidos de un péptido de FGF de tipo silvestre o mutante.

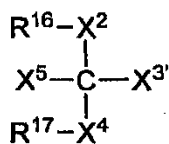
En una realización ejemplar, la invención proporciona un péptido, que se conjuga a través de un grupo de unión a glucosilo a un grupo de modificación polimérico. Los conjugados de péptido de FGF incluyen un grupo de unión de glucosilo que tiene una fórmula seleccionada de:



En las Fórmulas I y II, R² es H, CH₂OR⁷, COOR⁷, COO⁻M⁺ u OR⁷, en las que R⁷ representa H, alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir. Los símbolos R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁶ representan independientemente H, alquilo sustituido o sin sustituir, OR⁸, NHC(O)R⁹. M⁺ es un metal. El índice d es 0 o 1, R³ y R⁶ se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir o ácido siálico. Al menos uno de R³, R⁴, R⁵, R⁶ o R⁶ incluye el grupo de modificación polimérico, por ejemplo, PEG. En una realización ejemplar, R⁵ y R⁶, junto con el carbono al que están unidos son componentes de la cadena lateral de un residuo sialilo. En una realización ejemplar adicional, esta cadena lateral se funcionaliza con el grupo de modificación polimérico.

Como se analiza en la presente memoria, el PEG de uso en los conjugados de la invención puede ser lineal o ramificado. Un precursor ejemplar de uso para formar los conjugados peptídicos que contienen PEG ramificado de

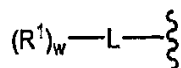
acuerdo con esta realización de la invención tiene la fórmula:



(III).

Las especies poliméricas ramificadas de acuerdo con esta fórmula son polímeros solubles en agua básicamente puros. X^3 es un residuo que incluye un grupo funcional ionizable (por ejemplo, OH, COOH, H_2PO_4 , HSO_3 , NH_2 , y sales de los mismos, etc.) u otro grupo funcional reactivo, por ejemplo, como se indica a continuación. C es carbono. X^5 , R^{16} y R^{17} se seleccionan independientemente de grupos no reactivos (por ejemplo, H, alquilo sin sustituir, heteroalquilo sin sustituir) y grupos poliméricos (por ejemplo, PEG). X^2 y X^4 son fragmentos de enlace que básicamente son preferiblemente no reactivos en condiciones fisiológicas, que pueden ser iguales o diferentes. Un enlazador ejemplar no incluye ni residuos aromáticos ni éster. Como alternativa, estas uniones pueden incluir uno o más residuos que están diseñados para degradarse en las condiciones fisiológicamente pertinentes, por ejemplo, ésteres, disulfuros, etc. X^2 y X^4 unen los grupos poliméricos R^{16} y R^{17} a C. Cuando X^3 se hace reaccionar con un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en un enlazador, el azúcar o casete enlazador-azúcar, X^3 se convierte en un componente del fragmento de unión X^3 .

En una realización ejemplar, el grupo de modificación polimérico está unido al grupo de unión a glucosilo, generalmente a través de un heteroátomo en el núcleo del glucosilo (por ejemplo, N, O), a través de un enlazador, L, como se muestra a continuación:



R^1 es el grupo de modificación polimérico y L se selecciona de un enlace y un grupo de unión. El índice w representa un número entero seleccionado de 1-6, preferiblemente 1-3, y más preferiblemente 1-2. Los grupos de unión ejemplares incluyen residuos alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y ácido siálico. Un componente ejemplar del enlazador es un residuo acilo. Otro grupo de unión ejemplar es un resto aminoacídico (por ejemplo, cisteína, serina, lisina y oligopéptidos cortos, por ejemplo, Lys-Lys, Lys-Lys-Lys, Cys-Lys, Ser-Lys, etc.)

Cuando L es un enlace, se forma por reacción de un grupo funcional reactivo en un precursor de R^1 y un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en un precursor del grupo de unión a glucosilo. Cuando L es un grupo de unión de orden distinto de cero, L puede estar en su lugar en el residuo glucosilo antes de la reacción con el precursor R^1 . Como alternativa, los precursores de R^1 y L pueden incorporarse en un casete preformado que se adjunta posteriormente al residuo glucosilo. Como se expone en la presente memoria, la selección y la preparación de precursores con grupos funcionales reactivos apropiados está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Además, el acoplamiento de los precursores procede por la química que se entiende bien en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante. El factor de crecimiento de fibroblastos mutante comprende uno o más sitios de glucosilación unidos a N o unidos a O que no están presentes en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el FGF-20 mutante tiene una secuencia de tipo silvestre correspondiente que codifica un factor de crecimiento de fibroblastos de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante incluye al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109 y 112-145. En algunas otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica el FGF-21 mutante tiene una secuencia de tipo silvestre correspondiente que codifica un factor de crecimiento de fibroblastos de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos incluye al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-360.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un casete de expresión o una célula que comprende un ácido nucleico, p. ej, un ácido nucleico aislado, que incluye una secuencia de polinucleótidos que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante incluye uno o más sitios de glucosilación unidos a N o unidos a O que no están presentes en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante que incluye uno o más sitios de glucosilación unidos a N o unidos a O que no está presente en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109 y 112-145. En algunas otras realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de

Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 161-214,220-320 y 323-360.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para crear un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante que incluye un sitio de glucosilación unido a N o unido a O que no está presente en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre. El procedimiento incluye las etapas de producir de manera recombinante el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, y glucosilar el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante en el nuevo sitio de glucosilación. En algunas realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109 y 112-145. En algunas otras realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 161-214,220-320 y 323-360.

En otro aspecto preferido, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que tiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante que incluye un sitio de glucosilación unido a N o unido a O no presente en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109 y 112-145. En algunas otras realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 161-214,220-320 y 323-360.

En cada uno de los aspectos descritos anteriormente, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante se conjuga opcionalmente con uno o más grupos modificadores, preferiblemente mediante glucoconjugación, dando lugar a un grupo de enlace glucosilo entre el sitio de glucosilación y el grupo modificador. Un ejemplo de un grupo modificador es el poli(etilenglicol).

Breve descripción de los dibujos

La **FIGURA 1A** presenta resultados de un análisis de SDS-PAGE de inducción de FGF-20 humano a diversa temperatura, tiempo, vector y cepas de *E. coli*: carriles 1 y 14: marcador de peso molecular (en kDa), (temperatura de inducción); carriles 2-9 y 15-18: 37 °C, carriles 10-13 y 19-22: 20 °C. Cepa usada: carriles 2-4 y 6-8 y 10-12, W3110; carriles 5, 9 y 13 BL21(DE3); carriles 15-17 y 19-21, *E.Coli* (trxb, gor, supp); carriles 18 y 22, *E.Coli* (trxb, gor, supp)(DE3). Vector usado, los carriles 2, 6, 10, 15, 19 usan el vector n.º 1; los carriles 3, 7, 11, 16,20 usan el vector n.º 2; los carriles 4, 8, 12, 17, 21 usan el vector n.º 3 y los carriles 5, 9, 13, 18 y 22 usan el vector n.º 4.

La **FIGURA 1B** presenta resultados de un análisis de SDS-PAGE de solubilidad de FGF-20 a diversa temperatura y cepas de *E. coli*: carril 1: marcador de peso molecular (en kDa). Los números pares representan sedimento y los impares representan sobrenadante. Temperaturas de inducción usadas: carriles 2-3: 20 °C; carriles 4-5: 30 °C; carriles 6-7: 37 °C; carriles 8-9: 37 °C. Cepas usadas: carriles 6-7, BL21(DE3); carriles 2-5 y 8-9, *E.Coli* (trxb, gor, supp)(DE3). Se empleó el vector n.º 4.

La **FIGURA 1C** representa resultados de un análisis de SDS-PAGE de inducción de FGF-21 humano a diversa temperatura, tiempo, vector y cepas de *E.Coli*: carril 1 y 15: marcador de peso molecular (en kDa), carril 2 sin inducción; (temperatura de inducción); carriles 3-10 y 16-20: 37 °C, carriles 11-14 y 21-23: 20 °C. Cepas usadas: carriles 3-5 y 7-9 y 11-13, W3110; carriles 6, 10 y 14 BL21(DE3); carriles 16-19 y 21-23, *E.Coli* (trxb, gor, supp); carril 20, *E.Coli* (trxb, gor, supp)(DE3). Vectores usados: los carriles 3, 7, 11, 17, 21 son el vector n.º 1; los carriles 4, 8, 12, 18,22 son el vector n.º 2; los carriles 5, 9, 13, 19 y 23 son el vector n.º 3 y los carriles 6, 10, 14 y 20 son el vector n.º 4.

La **FIGURA 1D** representa resultados de un análisis de SDS-PAGE de solubilidad de FGF-21 humano a diversa temperatura y cepas de *E. coli*, carril 1+1b: marcador de peso molecular (en kDa). Los números pares representan sedimento y los impares representan sobrenadante. Temperatura de inducción usada: carriles 2-3 y 6-7: 37 °C; carriles 4-5 y 8-9: 20 °C; carriles 11-12: 18 °C. Cepas usadas: carriles 2-5, W3110; carriles 6-12, *E.Coli* (trxb, gor, supp). Se empleó el vector n.º 3.

La **FIGURA 2** es una tabla que proporciona ejemplos de sialiltransferasas de uso en la formación de los glucoconjugados de la invención, por ejemplo, con péptidos glucoPEGilados con un ácido siálico modificado.

Descripción detallada de la invención y de las realizaciones preferidas

Abreviaturas

PEG, poli(etilenglicol); PPG, poli(propilenglicol); Ara, arabinosilo; Fru, fructosilo; Fuc, fucosilo; Gal, galactosilo; GalNAc, N-acetilgalactosaminilo; Glc, glucosilo; GlcNAc, N-acetilglucosaminilo; Man, manosilo; ManAc, manosaminil

acetato; Xil, xilosilo; NeuAc, sialilo o N-acetilneuraminilo; Sia, sialilo o N-acetilneuraminilo; y derivados y análogos de los mismos.

Definiciones

5 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta memoria tienen generalmente el mismo significado que el comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura empleada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos e hibridación, son los que se conocen bien y los que se emplean habitualmente en la técnica. Para la síntesis de ácidos nucleicos y de péptidos se usan técnicas convencionales. Las técnicas y los procedimientos que se proporcionan a lo largo de la memoria, se realizan generalmente según los procedimientos convencionales de la técnica y las diversas referencias bibliográficas generales (véase, en líneas generales, Sambrook y *col.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., que se incorpora en la presente memoria por referencia). La nomenclatura empleada en la memoria y los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica que se describen más adelante son los que se conocen bien y los que comúnmente se emplean en la técnica. Para la síntesis química y los análisis químicos se emplean técnicas convencionales, o modificaciones de las mismas.

20 Las expresiones "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refieren a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o a ácidos ribonucleicos (ARN) y a polímeros de los mismos en forma mono o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, las expresiones incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a la de los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otra manera, una secuencia de ácido nucleico particular también incluye implícitamente sus variantes modificadas de manera conservativa (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados puede realizarse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados se sustituye con restos mixtos de bases y/o desoxiinosina (Batzer y *col.*, Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka y *col.*, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); y Rossolini y *col.*, Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

30 El término "gen", significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica. Puede incluir regiones delante y detrás de la región codificante (líder y remolque) así como secuencias intercaladas (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

35 El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o a una proteína, significa que el ácido nucleico o la proteína carece esencialmente de otros componentes celulares con los que se asocia en el estado natural. Está preferiblemente en un estado homogéneo aunque puede estar en solución deshidratada o acuosa. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas químicas analíticas tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. 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 abierta que flanquean el gen y codifican una proteína distinta del gen de interés. El término "purificado" significa que un ácido nucleico o una proteína genera esencialmente una banda en un gel electroforético. Particularmente, 40 significa que el ácido nucleico o la proteína tiene una pureza de al menos 85 %, más preferiblemente una pureza de al menos 95 %, y lo más preferiblemente una pureza de al menos 99 %.

45 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintético, así como a análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de un modo similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácido se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, a un grupo carboxilo, a un grupo amino y a un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que la de un aminoácido de origen natural. Los análogos de aminoácido descritos en las siguientes solicitudes de patente pueden incorporarse en los conjugados peptídicos FGF y secuencias de FGF mutantes de la invención: Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 11/094677 (presentada el 29 de marzo de 2005); 11/094676 (presentada el 29 de marzo de 2005); 11/093798 (presentada el 29 de marzo de 2005); 11/093797 (presentada el 29 de marzo de 2005); 11/093597 (presentada el 29 de marzo de 2005); 10/965218 (presentada el 13 de octubre de 2004); 11/093797 (presentada el 29 de marzo de 2005); 11/009635 (presentada el 10 de diciembre de 2004); 11/016348 (presentada el 16 de diciembre de 2004); 10/825867 (presentada el 16 de abril de 2004); 10/826919 (presentada el 16 de abril de 2004); y 10/686944 (ahora Patente de Estados Unidos n.º 6.927.042, expedida el 9 de agosto de 2005). Los procedimientos descritos en estas solicitudes también pueden usarse para producir los conjugados peptídicos FGF y secuencias FGF mutantes de la invención. "Miméticos de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente a la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de un modo similar a como lo hace un aminoácido de origen natural.

En la técnica hay diversos procedimientos conocidos que permiten la incorporación de un derivado o análogo de aminoácido no natural en una cadena polipeptídica de una manera específica de sitio, véase, por ejemplo, el documento WO 02/086075.

5 En la presente memoria, los aminoácidos pueden denominarse por los símbolos de tres letras comúnmente conocidos y por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Del mismo modo, los nucleótidos pueden denominarse por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

10 Las “variantes modificadas de manera conservativa” se aplican tanto a secuencias de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico en particular, las “variantes modificadas de manera conservativa” se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, con respecto a las secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína determinada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición donde se especifique una alanina mediante un
15 codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente memoria que codifica un polipéptido, también describe cualquier posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que en un ácido nucleico, cada codón (excepto AUG, que es habitualmente el único codón de la metionina, y TGG que es habitualmente el único codón del triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente
20 idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

25 Al igual que para las secuencias de aminoácidos, un experto en la técnica reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales en una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altere, añada o suprima un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada, es una “variante modificada de manera conservativa”, donde la alteración produce la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. En la técnica se conocen bien las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de manera conservativa son, además de y sin excluir las variantes polimórficas, homólogos entre especies, y alelos de la invención.

30 Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido Glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 35 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (I), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

40 En la presente memoria, los aminoácidos pueden denominarse por los símbolos de tres letras comúnmente conocidos y por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Del mismo modo, los nucleótidos pueden denominarse por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

45 En la presente solicitud, los restos de aminoácido se numeran según sus posiciones relativas desde el resto más N terminal, que se numera como 1, en una secuencia polipeptídica de tipo silvestre no modificada.

“Próximo a un resto de prolina”, como se emplea en esta memoria, se refiere a un aminoácido que tiene una separación de menos de aproximadamente 10 aminoácidos de un resto de prolina, preferiblemente, una separación de menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos de un resto de prolina, más preferiblemente, una separación de menos de aproximadamente 4, 3, 2 o 1 resto de prolina. El aminoácido “próximo a un resto de prolina”
50 puede estar en el lado C o N terminal del resto de prolina.

En la presente memoria, “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente para referirse a un polímero donde los monómeros son aminoácidos y se unen mediante enlaces amida, denominados como alternativa,

polipéptido. Adicionalmente, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina. Los aminoácidos que no están codificados por genes también pueden usarse en la presente invención. Además, los aminoácidos que se han modificado para incluir grupos reactivos, sitios de glucosilación, polímeros, residuos terapéuticos, biomoléculas y similares también pueden usarse en la invención. Todos los aminoácidos empleados en la presente invención pueden ser el isómero D o el isómero L. Generalmente se prefiere el isómero L. Además, también son útiles otros peptidomiméticos en la presente invención. Como se emplea en esta memoria, "péptido" se refiere a péptidos tanto glucosilados como no glucosilados. También se incluyen péptidos que están incompletamente glucosilados por un sistema que expresa el péptido. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983).

La expresión "conjugado peptídico" se refiere a especies de la invención en las que un péptido está conjugado con un azúcar modificado como se expone en la memoria.

El término "FGF" o la expresión "Factor de Crecimiento de Fibroblastos" se refieren a cualquiera de la familia de los veinticinco péptidos de tipo silvestre conocidos. El término o la expresión también se refieren a las secuencias de aminoácidos con los mismos aminoácidos, con menos aminoácidos o con aminoácidos adicionales, en comparación con las secuencias de tipo silvestre. Los aminoácidos adicionales, que pueden ser naturales o no naturales, pueden insertarse en el inicio, en el centro o en el extremo de la secuencia de aminoácidos.

El término "mutar" o "mutación", como se usa en el contexto de introducir uno o más sitios de glucosilación unidos a N o unidos a O adicionales en un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre, se refiere a la delección, inserción o sustitución de cualquier nucleótido o resto de aminoácido, por medios químicos, enzimáticos o por cualquier otro medio, en una secuencia de polinucleótidos que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre o en la secuencia de aminoácidos de un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre, respectivamente, de tal manera que la secuencia de aminoácidos del Factor de Crecimiento de Fibroblastos resultante comprende al menos un sitio de glucosilación unido a N o unido a O que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente. En el caso de sustitución de aminoácidos, pueden usarse sustituciones tanto conservativas como no conservativas para crear un mutante FGF que contenga un nuevo sitio de glucosilación unido a N o unido a O.

El sitio para una mutación introduciendo un nuevo sitio de glucosilación unido a N o unido a O puede localizarse en cualquier parte en el polipéptido. Ejemplos de secuencias de aminoácidos para mutantes del Factor de Crecimiento de Fibroblastos se representan en las SEQ ID NO: 9-14, 18-22, 23-45, 48-65, 69-109, 112-145, 161-214, 220-320 y 323-360. Por tanto, un "Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante" de la presente invención comprende al menos una sustitución, una inserción de aminoácido o un resto de aminoácido mutado. Por otro lado, en esta solicitud, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre, cuya secuencia codificante se modifica para generar un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, puede denominarse "Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente" o simplemente "péptido de tipo silvestre". Por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del Factor 20 de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente para Factores de Crecimiento de Fibroblastos mutantes que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9-14, 18-22, 23-45, 48-65, 69-109 y 112-145. Del mismo modo, la SEQ ID NO: 146 es la secuencia de aminoácidos del Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente para los Factores de Crecimiento de Fibroblastos mutantes que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-360.

Las expresiones "cantidad eficaz" o "una cantidad eficaz para" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" o cualquier expresión gramaticalmente equivalente significa la cantidad que produce los efectos terapéuticos para los cuales se administra una sustancia. Los efectos incluyen la prevención, corrección, o inhibición de la progresión de los síntomas de una enfermedad/afección y complicaciones relacionadas a cualquier grado detectable. La cantidad exacta dependerá de la finalidad del tratamiento y la determinará un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, p. ej., Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); y Pickar, Dosage Calculations (1999)).

Como se emplea en esta memoria, la expresión "azúcar modificado", se refiere a un hidrato de carbono de origen natural o de origen no natural, que se añade enzimáticamente en un resto de aminoácido o de glucosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El azúcar modificado se selecciona de diversos sustratos enzimáticos entre los que se incluyen, pero no se limitan a, nucleótidos de azúcar (mono-, di- y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glucosilo, mesilatos de glucosilo) y azúcares que ni están activados ni son nucleótidos. El "azúcar modificado" se funcionaliza de manera covalente con un "grupo modificador". Los grupos modificadores útiles incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua (residuos de PEG), residuos terapéuticos, residuos de diagnóstico, biomoléculas y similares. El grupo modificador no es preferiblemente un hidrato de carbono de origen natural ni uno no modificado. El lugar de funcionalización con el grupo modificador se selecciona de forma que no impida que el "azúcar modificado" se añada enzimáticamente a un péptido.

La expresión "soluble en agua" se refiere a residuos que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. En la técnica son muy conocidos los procedimientos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua. Los ejemplos de

5 polímeros solubles en agua incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mixtas o estar compuestos de un solo aminoácido, p. ej., poli(lisina). Un ejemplo de polisacárido es el ácido(poli siálico). Un ejemplo de poli(éter) es poli(etilenglicol), p. ej., m-PEG. La poli(etilenimina) es una poliamina a modo de ejemplo y el ácido poli(acrílico) es un ácido(poli carboxílico) representativo.

La estructura polimérica del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol) (es decir PEG). Sin embargo, debe entenderse que también son adecuados otros polímeros relacionados para su uso en la práctica de la presente invención y que el uso de la expresión PEG o poli(etilenglicol) pretende ser inclusivo y no exclusivo a este respecto. La expresión PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo alcoxi PEG, PEG disfuncional, PEG de brazos múltiples, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes en la estructura polimérica) o PEG con enlaces degradables en su interior.

La estructura polimérica puede ser lineal o ramificada. Las estructuras poliméricas ramificadas se conocen en general en la técnica. Típicamente, un polímero ramificado tiene un residuo núcleo ramificado central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales ligadas al núcleo ramificado central. Normalmente, el PEG se usa en formas ramificadas que pueden producirse con la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El residuo ramificado central también puede proceder de diversos aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado puede estar representado en forma general como R(-PEG-OX)_m donde R representa el residuo núcleo, tal como glicerol o pentaeritritol, X representa un grupo protector con capuchón (*cap*) o un grupo terminal, y representando m el número de brazos. Las moléculas de PEG de brazos múltiples, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos n.º 5.932.462 que se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad, también pueden usarse como la estructura polimérica.

Muchos otros polímeros también son adecuados para la invención. Las estructuras poliméricas que son no peptídicas y solubles en agua, con de 2 a aproximadamente 300 términos, son particularmente útiles en la presente invención. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poliol(polioxietilado), alcohol(poli olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli(α-hidroxiácido), alcohol(poli vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.629.384, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos. Aunque el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica puede variar, esta está típicamente en el intervalo de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 100.000 Da, a menudo de aproximadamente 6.000 Da a aproximadamente 80.000 Da.

La expresión "ácido siálico" o "sialilo" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico) (abreviado a menudo como Neu5Ac, NeuAc, o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), donde el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano y col. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori y col., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). También se incluyen ácidos siálicos sustituidos en 9, tales como 9-O-acil C₁-C₆-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia del ácido siálico, véase, p. ej., Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, Nueva York (1992)). En la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992 se describe la síntesis y el uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación.

El "área bajo la curva" o ABC", como se emplea en esta memoria en el contexto de administrar un fármaco de péptido a un paciente, se define como el área total bajo la curva que describe la concentración de fármaco en la circulación sistémica en el paciente en función del tiempo de cero a infinito.

Al término "semivida" o "t_{1/2}", como se emplea en esta memoria en el contexto de administrar un fármaco de péptido a un paciente, se define como el tiempo requerido para que la concentración en plasma de un fármaco en un paciente se reduzca a la mitad. Puede haber más de una semivida asociada al fármaco de péptido dependiendo de múltiples mecanismos de eliminación, redistribución y otros mecanismos muy conocidos en la técnica. Normalmente, las semividas alfa y beta se definen de forma que la fase alfa está asociada con la redistribución y la fase beta está asociada con la eliminación. Sin embargo, con fármacos de proteína que, en general, están confinados en la corriente sanguínea, puede haber al menos dos semividas de eliminación. Para algunos péptidos glucosilados, la rápida eliminación de la fase beta puede estar mediada por receptores sobre macrófagos, o por células endoteliales que reconocen galactosa terminal, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa o fucosa. La eliminación de fase beta más lenta puede producirse mediante filtración glomerular renal para moléculas con un radio eficaz < 2 nm (aproximadamente 68 kD) y/o captación y metabolismo específico o inespecífico en tejidos. La glucoPEGilación puede proteger azúcares terminales (p. ej., galactosa o N-acetilgalactosamina) y así bloquear la rápida eliminación de la fase alfa mediante receptores que reconocen estos azúcares. También puede conferir un radio eficaz más grande y así disminuir el volumen de distribución y captación tisular, prolongando así la fase beta tardía. Por tanto, el

impacto exacto de la glucoPEGilación sobre las semividas de fase alfa y beta variará dependiendo del tamaño, del estado de glucosilación y de otros parámetros, como se sabe bien en la técnica. En *Pharmaceutical Biotechnology* (1997, DFA Crommelin and RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Ámsterdam, págs. 101-120) se amplía la explicación de "semivida".

5 El término "glucoconjugación", como se emplea en esta memoria, se refiere a la conjugación, mediada con enzimas de una especie de azúcar modificada, con un resto de aminoácido o un glucosilo de un polipéptido, p. ej., un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención. Un subgénero de "glucoconjugación" es la "glucoPEGilación" donde el grupo modificador del azúcar modificado es poli(etilenglicol), un derivado alquilo de PEG (por ejemplo, m-PEG) o un derivado reactivo de PEG (por ejemplo, H₂N-PEG, HOOC-PEG) del mismo.

10 Las expresiones "a gran escala" y "a escala industrial" se usan indistintamente y se refieren a un ciclo de reacción que produce al menos aproximadamente 250 mg, preferiblemente al menos aproximadamente 500 mg y más preferiblemente al menos aproximadamente 1 gramo de glucoconjugado al final de un solo ciclo de reacción.

La expresión "grupo de unión a glucosilo", como se emplea en esta memoria, se refiere a un residuo de glucosilo al cual se une un grupo modificador (por ejemplo, residuo de PEG, residuo terapéutico, biomolécula) de manera covalente; el grupo de unión a glucosilo conecta el grupo modificador con el resto del conjugado. En los procedimientos de la invención, el "grupo de unión a glucosilo" llega a conectarse de manera covalente a un péptido glucosilado o no glucosilado, de modo que une el agente a un resto de aminoácido y/o de glucosilo en el péptido. Un "grupo de unión a glucosilo" generalmente procede de un "azúcar modificado" mediante la conexión enzimática del "azúcar modificado" con un resto de aminoácido y/o de glucosilo del péptido. El grupo de unión a glucosilo puede ser una estructura derivada de sacárido que se degrada durante la formación del casete grupo modificador-azúcar modificado (p. ej., oxidación→formación de base de Schiff→reducción), o el grupo de unión a glucosilo puede estar intacto. Un "grupo de unión a glucosilo intacto" se refiere a un grupo de unión que procede de un residuo de glucosilo donde el monómero sacárido que se une al grupo modificador y al resto del conjugado no se degrada, por ejemplo, se oxida, p. ej., con metaperyodato sódico. Los "grupos de unión a glucosilo intactos" de la invención pueden proceder de un oligosacárido de origen natural mediante la adición de una o más unidades de glucosilo o la eliminación de una o más unidades de glucosilo de una estructura de sacárido parental.

La expresión, "grupo modificador no glucosídico", como se emplea en esta memoria, se refiere a grupos modificadores que no incluyen un azúcar de origen natural unido directamente al grupo de unión a glucosilo.

30 Como se emplea en esta memoria, un "agente radiactivo" incluye cualquier radioisótopo que sea eficaz en el diagnóstico o destrucción de un tumor. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, indio 111 y cobalto 60. Además, elementos radiactivos de origen natural, tales como uranio, radio y torio, que normalmente representan mezclas de radioisótopos, son ejemplos adecuados de un agente radiactivo. Los iones metálicos están típicamente quelados con un residuo quelante orgánico.

35 En la técnica se conocen muchos grupos quelantes, éteres de corona, criptandos y similares útiles y pueden incorporarse en los compuestos de la invención (por ejemplo, EDTA, DTPA, DOTA, NTA, HDTA, etc. y sus análogos de fosfonato tales como DTPP, EDTP, HDTP, NTP, etc.). Véanse, por ejemplo, Pitt y *col.*, "The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload", In, *INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE*; Martell, Ed.; American Chemical Society, Washington, D. C., 1980, págs. 279-312; Lindoy, *THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES*; Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, *BIOORGANIC CHEMISTRY*; Springer-Verlag, Nueva York, 1989, y referencias en su interior.

45 Además, los expertos en la técnica disponen de una serie de vías que permiten la unión de agentes quelantes, éteres de corona y ciclodextrinas a otras moléculas. Véase, por ejemplo, Meares y *col.*, "Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides". In, *MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS*"; Feeney, y *col.*, Eds., American Chemical Society, Washington, D. C., 1982, págs. 370-387; Kasina y *col.*, *Bioconjugate Chem.*, 9: 108-117 (1998); Song y *col.*, *Bioconjugate Chem.*, 8: 249-255 (1997).

50 Como se emplea en esta memoria, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material, que cuando se combina con el conjugado, conserva la actividad del conjugado y no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquier vehículo farmacéutico convencional tal como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua y varios tipos de agentes humectantes. Otros vehículos pueden incluir también disoluciones estériles, comprimidos, incluidos los comprimidos recubiertos y cápsulas. Típicamente, dichos vehículos contienen excipientes, tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, estearato de magnesio o de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos pueden incluir también aditivos aromatizantes y colorantes u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos.

55 Como se emplea en esta memoria, "administración", significa administración oral, inhalación, administración como un supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o subcutánea, o el implante al sujeto de un dispositivo de liberación lenta, p. ej., una minibomba osmótica. La

- administración es mediante cualquier vía, incluyendo la vía parenteral y transmucosa (p. ej., oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intramuscular, intra-arteriolar, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Además, cuando la inyección es para tratar un tumor, p. ej., inducir apoptosis, la administración puede ser directamente en el tumor y/o en tejidos que rodean el tumor. Otros modos de liberación incluyen, pero no se limitan a, el uso de formulaciones liposomales, infusiones intravenosas, parches transdérmicos, etc.
- La expresión “mejora” o “mejoría” se refiere a cualquier señal de éxito en el tratamiento de una patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como supresión, remisión o disminución de los síntomas o una mejoría en el bienestar físico o mental del paciente. La mejoría de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de una exploración física y/o una evaluación psiquiátrica.
- La expresión “terapia” se refiere a “tratamiento” o “tratar” una enfermedad o afección, incluyendo la prevención de la aparición de la enfermedad o afección en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no padece o presenta los síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), la inhibición de la enfermedad (ralentizando o deteniendo su desarrollo), proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo tratamiento paliativo) y alivio de la enfermedad (causar la regresión de la enfermedad).
- El término “aislado” se refiere a un material que carece sustancial o esencialmente de componentes que se usan para producir el material. Para los conjugados peptídicos de la invención, el término “aislado” se refiere a material que carece sustancial o esencialmente de componentes, que normalmente acompañan al material en la mezcla que se utiliza para producir el conjugado peptídico. Los términos “aislado” y “puro” se usan de manera indistinta. Típicamente, los conjugados peptídicos aislados de la invención tienen un nivel de pureza que se expresa preferiblemente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza para los conjugados peptídicos es de aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 % y el extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o más de aproximadamente 90 %.
- Cuando los conjugados peptídicos tienen una pureza superior a aproximadamente 90 %, sus purezas también se expresan preferiblemente, como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza es de aproximadamente 90 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 % o aproximadamente 98 %. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 98 % o de aproximadamente 100 %.
- La pureza se determina mediante cualquier procedimiento de análisis reconocido en la técnica (por ejemplo, intensidad de la banda en un gel teñido con plata, electroforesis en gel de poliacrilamida, HPLC o un medio similar).
- “Esencialmente cada miembro de la población”, como se emplea en esta memoria, describe una característica de una población de conjugados peptídicos de la invención, donde un porcentaje seleccionado de los azúcares modificados añadidos a un péptido, se añaden a múltiples sitios aceptores idénticos, sobre el péptido. “Esencialmente cada miembro de la población” hace mención a la “homogeneidad” de los sitios sobre el péptido conjugado con un azúcar modificado y se refiere a conjugados de la invención que tienen una homogeneidad de al menos aproximadamente 80 %, preferiblemente al menos aproximadamente 90 % y más preferiblemente al menos aproximadamente 95 %.
- “Homogeneidad” se refiere a la regularidad estructural en toda una población de residuos aceptores con los que se conjugan los azúcares modificados. Por tanto, en un conjugado peptídico de la invención donde cada residuo de azúcar modificado está conjugado con un sitio aceptor que tiene la misma estructura que la del sitio aceptor con el que están conjugados los demás azúcares modificados, se dice que el conjugado peptídico tiene una homogeneidad de aproximadamente 100 %. Típicamente, la homogeneidad se expresa como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad para los conjugados peptídicos es de aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 % y el extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o más de aproximadamente 90 %.
- Cuando los conjugados peptídicos tienen una homogeneidad superior o igual a aproximadamente el 90 %, su homogeneidad también se expresa, preferiblemente, como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad es de aproximadamente 90 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 % o aproximadamente 98 %. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 100 %. La pureza de los conjugados peptídicos se determina típicamente mediante uno o más procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM), espectrometría de tiempo de vuelo-desorción láser asistida por matriz (MALDITOF), electroforesis capilar y similares.
- “Glucoforma sustancialmente uniforme” o un “patrón de glucosilación sustancialmente uniforme”, cuando hace referencia a una especie glucopeptídica, se refiere al porcentaje de residuos aceptores que están glucosilados mediante la glucosiltransferasa de interés (por ejemplo, fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de una α 1,2 fucosiltransferasa, existe un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme si sustancialmente todo (como se

define más adelante) el Gal β 1,4-GlcNAc-R y sus análogos sialilados están fucosilados en un conjugado peptídico de la invención. Un experto en la técnica entenderá que el material de partida puede contener residuos aceptores glucosilados (por ejemplo, residuos de Gal β 1,4-GlcNAc-R fucosilados). Por tanto, el porcentaje de glucosilación calculado incluirá residuos aceptores que están glucosilados mediante los procedimientos de la invención, así como los residuos aceptores ya glucosilados en el material de partida.

En las definiciones de "sustancialmente uniforme" anteriores, el término "sustancialmente" significa, en general, que al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, o más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 %, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 95 % de los residuos aceptores para una glucosiltransferasa particular están glucosilados.

Cuando los grupos de sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, incluyen igualmente los sustituyentes químicamente idénticos, que resultarán de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, -CH₂O- también pretende leerse -OCH₂-.

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de sustituyente, se refiere, a menos que se indique otra cosa, a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, o cíclico, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono o poliinsaturado y puede incluir radicales di y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen, pero no se limitan a, 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 no se limitan a, 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 superiores. El término "alquilo", a menos que se indique otra cosa, también pretende incluir aquellos derivados de alquilo definidos en más detalle a continuación, tal como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos hidrocarburo se denominan "homoalquilo".

El término "alquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical divalente obtenido a partir de un alcano, como se ilustra, pero no se limita a, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, e incluye adicionalmente aquellos grupos descritos a continuación como "heteroalquileo". Típicamente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, teniendo estos grupos 10 o menos átomos de carbono que sean preferidos en la presente invención. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, generalmente que tenga ocho o menos átomos de carbono.

Las expresiones "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refiere a los 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", por sí mismo o junto con otro término, se refiere, a menos que se indique otra cosa, a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada estable, o cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede cuaternizarse opcionalmente. El heteroátomo o 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 no se limitan a, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃ y -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Pueden ser consecutivos hasta dos heteroátomos, tales como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. De forma análoga, el término "heteroalquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical divalente obtenido a partir de heteroalquilo, como se ilustra, pero no se limita a, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar cualquier o ambos de los extremos de la cadena (por ejemplo, alquileooxi, alquileoodioxi, alquileoamino, alquileo diamino, y similares). Aún adicionalmente, para los grupos de unión a alquileo y heteroalquileo, no está implícita ninguna orientación del grupo de unión por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula -C(O)₂R' representa tanto -C(O)₂R' como -R'C(O)₂-.

Las expresiones "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismas o junto con otros términos, representan, a menos que se indique otra cosa, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo se une al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 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, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares.

Las expresiones "halo" o "halógeno", por sí mismas o como parte de otro sustituyente, se refiere, a menos que se indique otra cosa, a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, los términos, tales como "haloalquilo", pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo (C₁-C₄)" pretende incluir,

pero no se limita a, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y similares.

- El término "arilo" se refiere, a menos que se indique otra cosa, a un sustituyente poliinsaturado, aromático, que puede ser un anillo sencillo o múltiples anillos (preferiblemente de 1 a 3 anillos), que se condensan juntos o unidos covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre se oxidan opcionalmente, y el átomo o átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede unirse 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, tetrazolilo, benzo[b]furanilo, benzo[b]tienilo, 2,3-dihidrobencol[1,4]dioxin-6-ilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas anulares arilo y heteroarilo que se han indicado anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables que se describe a continuación.
- Para mayor brevedad, el término "arilo", cuando se usa junto con otros términos (por ejemplo, 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 (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares), incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) se ha reemplazado por, por ejemplo, un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretende incluir tanto formas sustituidas como sin sustituir del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

- Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos denominados con frecuencia como alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenil) se denominan en general como "sustituyentes del grupo alquilo", y pueden ser uno o más de una diversidad de grupos seleccionados de, 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'')=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), donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. Cada uno de R', R'', R''' y R'''' se refiere preferiblemente independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, por ejemplo, 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 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 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir del análisis anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos de hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

- De forma análoga a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan en general como "sustituyentes del grupo arilo". Los sustituyentes se seleccionan de, por ejemplo: 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'')=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 anular aromático; y donde R', R'', R''' y R'''' se seleccionan preferiblemente independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir. 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 más de uno de estos grupos está presente. En los esquemas a continuación, el símbolo X representa "R" como se ha descrito anteriormente.

- Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -T-C(O)-(CRR')_u-U-, en donde T y U son independientemente NR-, -O-, -CRR'- o un enlace sencillo, y u es un número entero de 0 a 3. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula A-(CH₂)_r-B-, en donde A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede reemplazarse opcionalmente con un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula-(CRR')_z-X-(CR''R''')_d-, en donde z y d son números enteros independientemente de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, o -S(O)₂NR'-. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' se seleccionan preferiblemente independientemente de hidrógeno o

alquilo (C₁-C₆) sustituido o sin sustituir.

Como se usa en esta memoria, el término "heteroátomo" pretende incluir oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

Introducción

5 FGF-9 es un factor de crecimiento de fibroblastos que se expresa como una proteína segregada en el cerebro y en el endometrio uterino. Se piensa que la proteína de unión a heparina de 208 aminoácidos no está glucosilada en su estado de tipo silvestre. Como un factor de crecimiento autocrino/paracrino, el FGF-9 desempeña un papel importante en el desarrollo de células gliales y en la proliferación y activación de otras células que expresan receptores de FGF, tales como los encontrados en las neuronas motoras y en la próstata.

10 El FGF-18 es otro miembro de la familia de FGF que está implicado en la estimulación de la proliferación hepática e intestinal y es un regulador esencial de diferenciación de hueso y cartilago. Al igual que FGF-9, también se piensa que no está glucosilado en su estado de tipo silvestre. Esta proteína de 207 aminoácidos también está implicada en el desarrollo pulmonar posnatal a través de la estimulación de la proliferación y diferenciación de miofibroblastos. Inducido por la calcineurina, el FGF-18 tiene la capacidad de reprimir la expresión de la nogina y actúa como un agente neuroprotector eficaz.

15 El FGF-20 es un nuevo factor de crecimiento de fibroblastos que se expresa como una proteína secretada en el cerebro (por ejemplo, en el cerebelo y en la parte compacta de la sustancia negra) y se expresa en *E. coli* como un monómero de peso molecular aparente de 23 kDa. Se piensa que esta proteína de unión a heparina de 211 aminoácidos no está glucosilada en su estado de tipo silvestre. Sus actividades biológicas incluyen neurogénesis, neuroprotección, regeneración del SNC, efectos antiinflamatorios (por ejemplo, agente antiinflamatorio intestinal) y curación de heridas, haciendo que sea un agente útil para el tratamiento de enfermedades tales como Parkinson y Alzheimer. El FGF-20 también puede usarse como un agente profiláctico o mitigante contra toxicidad por radiación en el tracto GI y en otras partes del cuerpo, p. ej., que proviene de quimio y radioterapia, terrorismo nuclear/radiológico, accidentes de radiación, etc. En diversos estudios, se ha demostrado que el FGF-20 es eficaz en la prevención y tratamiento de mucositis oral, una afección caracterizada por síntomas que varían de eritema leve a ulceraciones dolorosas graves.

20 El FGF-21, otro factor de crecimiento de fibroblastos nuevo, se expresa en tejido hepático, tímico y testicular. Se piensa también que la proteína de 209 aminoácidos no está glucosilada en el estado de tipo silvestre. En estudios recientes, se ha observado que el FGF-21 regula la captación de glucosa en adipocitos humanos, lo que sugiere su papel como un regulador metabólico. Su efecto sobre la actividad de la insulina y su regulación de la lipólisis hace que el FGF-21 sea un tratamiento útil para la diabetes de tipo II y la obesidad. Se ha implicado en diversas enfermedades caracterizadas por la pérdida completa o parcial de función celular, tisular u orgánica así como por anomalías en la función o número de células y/o tejidos. El FGF-21 también tiene numerosas otras aplicaciones terapéuticas, como se describirá más adelante.

25 Una enfermedad que puede tratarse con FGF-21 es la enfermedad vascular isquémica. El tratamiento con el péptido puede inducir angiogénesis terapéutica o preservar la función/supervivencia de células en pacientes que padecen enfermedades tales como isquemia miocárdica/infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, arteriopatía renal, o ictus, etc.

30 Otras enfermedades para las cuales puede ser útil la terapia con FGF-21 incluyen cardiomiopatías, que se caracterizan por pérdida de función o muerte de miocitos cardiacos o soporte de células en el corazón como ocurre, p. ej., en la insuficiencia cardiaca congestiva, miocarditis y enfermedades musculo esqueléticas, que se caracterizan por pérdida de función, función inadecuada o muerte de miocitos esqueléticos, osteocitos o células de soporte, p. ej., miopatías esqueléticas, enfermedad ósea y artritis. Además, con el FGF-21 pueden tratarse defectos congénitos, p. ej., en hígado, corazón, pulmón, cerebro, extremidades, riñón, etc. que surgen de la pérdida de FGF-21 o de su función.

35 Los polipéptidos y polinucleótidos de FGF-21 también puede facilitar la curación de heridas que se originan de traumatismo, enfermedades, tratamiento médico o quirúrgico, y ayudan en la regeneración celular y tisular requerida debido a las circunstancias anteriores. Por ejemplo, el FGF-21 puede efectuar regeneración hepática, curación de heridas operatorias, reendotelización de vasos sanguíneos dañados, curación de heridas traumáticas, curación de úlceras debido a enfermedad vascular, metabólica, etc., fracturas óseas, pérdida de células debido a enfermedad inflamatoria, etc.

40 Para mejorar la eficacia del FGF recombinante usado para fines terapéuticos, la presente invención proporciona conjugados de péptidos de FGF con un grupo modificador. Algunos de los péptidos en estos conjugados peptídicos de FGF tienen la misma secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que la del FGF de tipo silvestre, aunque otros son mutantes.

45 Los grupos modificadores pueden seleccionarse de grupos modificadores poliméricos tales como, p. ej., PEG (m-PEG), PPG (m-PPG), etc., residuos terapéuticos, residuos de diagnóstico, residuos diana y similares. La creación de

un conjugado peptídico de FGF, por ejemplo, añadiendo un grupo modificador polimérico soluble en agua, puede mejorar la estabilidad y el tiempo de retención de FGF en la circulación de un paciente, y/o reducir la antigenicidad de FGF.

5 Los conjugados peptídicos de la invención pueden formarse mediante la unión enzimática a un azúcar modificado con un péptido glucosilado o no glucosilado. Un sitio de glucosilación de aminoácido y/o un grupo glucosilo proporciona un lugar para la conjugación de un azúcar modificado que lleva un grupo modificador en el péptido, p. ej., mediante glucoconjugación.

10 La presente invención también proporciona mutantes modificados genéticamente del Factor de Crecimiento de Fibroblastos que contienen sitios de glucosilación unidos a N o unidos a O no presentes en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de origen natural. Aunque estos mutantes de FGF conservan sustancialmente la actividad biológica de la hormona de tipo silvestre, los sitios de glucosilación recién introducidos permiten que los mutantes de FGF producidos de manera recombinante estén glucosilados en una gran variedad de patrones.

15 Los procedimientos de la invención también hacen que sea posible ensamblar conjugados peptídicos y conjugados glucopeptídicos que tienen un patrón de derivatización sustancialmente homogéneo. Las enzimas que se usan en la invención son generalmente selectivas para un resto de aminoácido particular, para la combinación de restos de aminoácido, restos de glucosilo particulares o una combinación de restos de glucosilo del péptido. Los procedimientos también son prácticos para la producción a gran escala de conjugados peptídicos. Por tanto, los procedimientos de la invención proporcionan un medio práctico para la preparación a gran escala de conjugados peptídicos que tienen patrones de derivatización uniformes preseleccionados. Los procedimientos están particularmente bien adaptados para la modificación de péptidos terapéuticos, entre los que se incluyen, pero no se limitan a, glucopéptidos que están incompletamente glucosilados durante la producción en células de cultivo celular (por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, células fúngicas, células de levadura o células procariotas) o en plantas o animales transgénicos.

25 Los conjugados peptídicos de FGF pueden incluirse en formulaciones farmacéuticas que comprenden un conjugado peptídico de FGF así como un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona conjugados de péptidos de FGF con semivida terapéutica aumentada debido, por ejemplo, a una tasa de eliminación reducida, o a una tasa de captación reducida por el sistema inmunitario o retículoendotelial (RES). Además, los procedimientos de la invención proporcionan un medio para enmascarar determinantes antigénicos en péptidos, reduciendo o eliminando de este modo una respuesta inmunitaria del hospedador contra el péptido. La unión selectiva de agentes diana también puede usarse para dirigir un péptido a un receptor de superficie celular o tisular particular que es específico para el agente diana particular.

Los mutantes

35 La presente invención proporciona mutantes de FGF que incluyen uno o más sitios de glucosilación unidos a O o unidos a N que no se encuentran en el péptido de tipo silvestre. Los mutantes son sustratos para la glucosilación enzimática en uno o más sitios que normalmente no estarían glucosilados, o estarían poco glucosilados, en el péptido de tipo silvestre. Por tanto, los mutantes permiten modificar por ingeniería genética la posición de un residuo de glucosilo o un grupo de unión a glucosilo para obtener un péptido con propiedades deseables seleccionadas. Además de la posición y del número de residuos de glucosilo o de grupos de unión a glucosilo, usando los mutantes y los procedimientos de la invención, pueden cambiarse otras propiedades, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas, resistencia a proteólisis, inmunogenicidad, reconocimiento por el sistema retículoendotelial, distribución tisular y propiedades similares.

40 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende un sitio de glucosilación unido a N o unido a O que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109 y 112-145. En algunas otras realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-360. En una realización ejemplar, un péptido que tiene actividad de Factor de Crecimiento de Fibroblastos tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias de aminoácidos expuestas en la presente memoria. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos tiene una homología de al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con las secuencias de aminoácidos expuestas en la presente memoria.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un casete de expresión o una célula que comprende un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico aislado, incluyendo una secuencia de polinucleótidos que codifica un factor de crecimiento de fibroblastos mutante. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante incluye uno o más sitios

de glucosilación unidos a N o unidos a O que no existen en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, que incluye un sitio de glucosilación unido a N o unido a O que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109 y 112-145. En algunas otras realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-360. En una realización ejemplar, un péptido que tiene actividad de Factor de Crecimiento de Fibroblastos tiene una homología de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias de aminoácidos expuestas en la presente memoria. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos tiene una homología de al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con las secuencias de aminoácidos expuestas en a presente memoria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para construir un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante que incluye un sitio de glucosilación unido a N o unido a O que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente. Este procedimiento comprende las etapas de producir de manera recombinante el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, y glucosilar el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante en el nuevo sitio de glucosilación. En algunas realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109 y 112-145. En algunas otras realizaciones, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas realizaciones preferidas, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-360. En una realización ejemplar, un péptido que tiene una actividad de Factor de Crecimiento de Fibroblastos tiene una secuencia de aminoácidos con una homología de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias de aminoácidos expuestas en la presente memoria. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos tiene una homología de al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con las secuencias de aminoácido expuestas en la presente memoria.

Adquisición de secuencias codificantes de FGF

Tecnología recombinante general

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

El tamaño de los ácidos nucleicos se da en kilobases (kb) o en pares de bases (pb). Estas son estimaciones procedentes de electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, de ácidos nucleicos secuenciados, o de secuencias de ADN publicadas. El tamaño de las proteínas se da en kilodalton (kDa) o en número de restos de aminoácido. El tamaño de las proteínas se calcula mediante electroforesis en gel, proteínas secuenciadas, secuencias de aminoácido derivadas o de secuencias de proteínas publicadas.

Los oligonucleótidos que no están disponibles en el comercio pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo, según el procedimiento de fosforamidita triéster en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862 (1981), usando un sintetizador automático, como describen Van Devanter y *col.*, *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984). La purificación de oligonucleótidos se realiza usando cualquier estrategia reconocida en la técnica, por ejemplo, electroforesis en gel de acrilamida natural o HPLC de intercambio aniónico descrita por Pearson y Reanier, *J. Chrom.* 255: 137-149 (1983).

La secuencia de los genes del factor de crecimiento de fibroblastos de tipo silvestre clonados, de los polinucleótidos que codifican Factores de Crecimiento de Fibroblastos mutantes y de los oligonucleótidos sintéticos puede verificarse después de la clonación usando, por ejemplo, el procedimiento de terminación de cadena para la secuenciación de moldes bicatenarios de Wallace y *col.*, *Gene* 16: 21-26 (1981).

Clonación y subclonación de una secuencia codificante de FGF de tipo silvestre

Se han determinado diversas secuencias polinucleotídicas que codifican un Factor-20 de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre, por ejemplo, n.º de registro del GenBank NM_019851, NM_019113 y pueden obtenerse en un proveedor comercial.

El rápido avance en los estudios del genoma humano ha hecho posible una estrategia de clonación donde puede investigarse una base de datos de secuencias de ADN humano para cualquier segmento génico que tenga un

determinado porcentaje de homología de secuencia con una secuencia de nucleótidos conocida, tal como una que codifique un Factor de Crecimiento de Fibroblastos previamente identificado. Cualquier secuencia de ADN identificada de este modo puede obtenerse posteriormente mediante síntesis química y/o una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tal como un procedimiento de extensión superpuesto. Para una secuencia corta, puede bastar la síntesis completamente *de novo*; mientras que para obtener un gen más grande puede ser necesario el aislamiento adicional de la secuencia codificante de longitud completa de una biblioteca genómica o de ADNc humano usando una sonda sintética.

Como alternativa, puede aislarse una secuencia de ácido nucleico que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de una biblioteca de ADN genómico o de ADNc humano usando técnicas de clonación convencionales tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde los cebadores basados en homología a menudo pueden proceder de una secuencia de ácido nucleico conocida que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos. Las técnicas más habitualmente utilizadas para este fin se describen en textos convencionales, por ejemplo, Sambrook y Russell, citados anteriormente.

Las bibliotecas de ADNc adecuadas para obtener una secuencia codificante para un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre pueden adquirirse en el comercio o pueden construirse. Se conocen bien procedimientos generales de aislamiento de ARNm, de preparación de ADNc por transcripción inversa, de ligamiento de ADNc en un vector recombinante, de transfección en un hospedador recombinante para su propagación, de exploración y clonación (véase, p. ej., Gubler y Hoffman, *Gene*, 25: 263-269 (1983); Ausubel y *col.*, citados anteriormente). Después de obtener un segmento amplificado de una secuencia de nucleótidos por PCR, el segmento puede usarse adicionalmente como una sonda para aislar la secuencia de polinucleótidos de longitud completa que codifica el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre de la biblioteca de ADNc. En Sambrook y Russell, citados anteriormente, puede encontrarse una descripción general de procedimientos apropiados.

Para obtener una secuencia de longitud completa que codifique un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre, por ejemplo, uno cualquiera de los n.º de registro del GenBank mencionados anteriormente, de una genoteca humana, se puede seguir un procedimiento similar. Las genotecas humanas pueden obtenerse en el comercio o construirse según los diversos procedimientos reconocidos en la técnica. En general, para construir una genoteca, primero se extrae el ADN de un tejido donde es probable que se encuentra el Factor de Crecimiento de Fibroblastos. Después, el ADN se corta mecánicamente o se somete a digestión enzimática para producir fragmentos de aproximadamente 12-20 kb de longitud. Posteriormente, los fragmentos se separan, por centrifugación en gradiente, de los fragmentos polinucleotídicos de tamaños no deseados y se insertan en vectores de bacteriófago λ . Estos vectores y fagos se empaquetan *in vitro*. Los fagos recombinantes se analizan mediante hibridación en placas como se describe en Benton y Davis, *Science*, 196: 180-182 (1977). La hibridación de colonias se realiza como describen Grunstein y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 3961-3965 (1975).

Basándose en la homología de secuencias, pueden diseñarse oligonucleótidos degenerados como conjuntos de cebadores y la PCR puede realizarse en condiciones adecuadas (véase, por ejemplo, White y *col.*, *PCR Protocols: Current Methods and Applications*, 1993; Griffin y Griffin, *PCR Technology*, CRC Press Inc. 1994) para amplificar un segmento de secuencias de nucleótidos de una biblioteca de ADNc o genómica. Usando el segmento amplificado como una sonda, se obtiene el ácido nucleico de longitud completa que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre.

Después de adquirir una secuencia de ácido nucleico que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre, la secuencia codificante puede subclonarse en un vector, por ejemplo, un vector de expresión, de tal manera que puede producirse un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre recombinante a partir de la construcción resultante. Posteriormente, para alterar las características de la molécula, pueden realizarse modificaciones adicionales a la secuencia codificante del Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre, por ejemplo, sustituciones de nucleótidos.

Introducción de mutaciones en una secuencia del FGF

A partir de una secuencia de polinucleótidos codificante, puede determinarse la secuencia de aminoácidos de un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 146. Posteriormente, esta secuencia de aminoácidos puede modificarse para alterar el patrón de glucosilación de la proteína, introduciendo uno o más sitios de glucosilación adicionales en diversos lugares en la secuencia de aminoácidos.

En la técnica se conocen bien diversos tipos de sitios de glucosilación de proteínas. Por ejemplo, en eucariotas, la glucosilación unida a N se produce en la asparagina de la secuencia consenso Asn-X_{aa}-Ser/Thr, en la cual X_{aa} es cualquier aminoácido excepto prolina (Kornfeld y *col.*, *Ann Rev Biochem* 54: 631-664 (1985); Kukuruzinska y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2145-2149 (1987); Herscovics y *col.*, *FASEB J* 7: 540-550 (1993); y Orlean, *Saccharomyces Vol. 3* (1996)). La glucosilación unida a O tiene lugar en restos de serina o de treonina (Tanner y *col.*, *Biochim. Biophys. Acta*. 906: 81-91 (1987); y Hounsell y *col.*, *Glycoconj. J.* 13: 19-26 (1996)). Otros patrones de glucosilación se forman uniendo glucosilfosfatidilinositol con el grupo carboxilo del extremo carboxilo de la proteína

(Takeda y col., Trends Biochem. Sci. 20: 367-371 (1995); y Udenfriend y col., Ann. Rev. Biochem. 64: 593-591 (1995). Por tanto, en base a este conocimiento, pueden introducirse mutaciones adecuadas en una secuencia del Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre para formar nuevos sitios de glucosilación.

Aunque la modificación directa de un resto de aminoácido dentro de una secuencia polipeptídica del Factor de Crecimiento de Fibroblastos puede ser adecuada para introducir un nuevo sitio de glucosilación unido a N o unido O, más frecuentemente, la introducción de un nuevo sitio de glucosilación se realiza mutando la secuencia de polinucleótidos que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos. Esto puede realizarse usando cualquiera de los procedimientos de mutagénesis conocidos, algunos de los cuales se analizan más adelante. Las modificaciones ejemplares en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos incluyen las ilustradas en las SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 87.

En la técnica se han establecido y descrito diversos protocolos de generación de mutaciones. Véase, por ejemplo, Zhang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4504-4509 (1997); y Stemmer, Nature, 370: 389-391 (1994). Los procedimientos pueden usarse individualmente o en combinación para producir variantes de un conjunto de ácidos nucleicos, y por tanto variantes de polipéptidos codificados. En el comercio se dispone de kits para mutagénesis, construcción de bibliotecas y de otros procedimientos de generación de diversidad.

Los procedimientos mutacionales de generación de diversidad incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio (Botstein y Shortle, Science, 229: 1193-1201 (1985)), mutagénesis usando moldes que contienen uracilo (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 488-492 (1985)), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos (Zoller y Smith, Nucl. Acids Res., 10: 6487-6500 (1982)), mutagénesis de ADN modificado con fosforotioato (Taylor y col., Nucl. Acids Res., 13: 8749-8764 y 8765-8787 (1985)), y mutagénesis utilizando ADN bicatenario abierto (Kramer y col., Nucl. Acids Res., 12: 9441-9456 (1984)).

Otros posibles procedimientos para generar mutaciones incluyen reparación de emparejamiento puntual (Kramer y col., Cell, 38: 879-887 (1984)), mutagénesis usando cepas hospedadoras deficientes en reparación (Carter y col., Nucl. Acids Res., 13: 4431-4443 (1985)), mutagénesis por delección (Eghtedarzadeh y Henikoff, Nucl. Acids Res., 14: 5115 (1986)), selección-restricción y purificación-restricción (Wells y col., Phil. Trans. R. Soc. Lond. A, 317: 415-423 (1986)), mutagénesis por síntesis génica total (Nambiar y col., Science, 223: 1299-1301 (1984)), reparación de rotura de cadena doble (Mandecki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 7177-7181 (1986)), mutagénesis por el procedimiento de terminación de cadena polinucleotídica (Patente de Estados Unidos n.º 5.965.408) y PCR propensa a error (Leung y col., Biotechniques, 1: 11-15 (1989)).

Modificación de ácidos nucleicos para el uso de codones preferidos en un organismo hospedador

La secuencia de polinucleótidos que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante puede alterarse adicionalmente para que coincida con el uso de codones preferidos de un hospedador particular. Por ejemplo, puede emplearse el uso de codones preferido de una cepa de células bacterianas para obtener un polinucleótido que codifique un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la invención e incluye los codones preferidos por esta cepa. La frecuencia de uso de codones preferido mostrada por una célula hospedadora puede calcularse estableciendo el promedio de frecuencia del uso de codones preferido en una gran cantidad de genes expresados por la célula hospedadora (por ejemplo, el servicio de cálculo disponible en el sitio web del Instituto de Investigación de ADN de Kazusa, Japón). Este análisis está preferiblemente limitado a genes que la célula hospedadora expresa a altos niveles. La Patente de Estados Unidos n.º 5.824.864, por ejemplo, proporciona la frecuencia del uso de codones por genes expresados a altos niveles mostrada por plantas dicotiledóneas y plantas monocotiledóneas.

Al final de la modificación, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante que codifica las secuencias se verifica por secuenciación y después se subclona en un vector de expresión apropiado para la producción recombinante de la misma manera que los Factores de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre.

Expresión y purificación del FGF mutante

Después de la verificación de la secuencia, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención puede producirse usando técnicas habituales en el campo de genética recombinante, basándose en las secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido descrito en la presente memoria.

Sistemas de expresión

Para obtener un alto nivel de expresión de un ácido nucleico que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención, típicamente se subclona un polinucleótido que codifica el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción y un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. En la técnica se conocen bien promotores bacterianos adecuados y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, citados anteriormente y en Ausubel y col., citados anteriormente. Los sistemas de expresión bacterianos para expresar el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre mutante se encuentran disponibles, por ejemplo, en *E. coli*, *Bacillus* sp., *Salmonella* y *Caulobacter*. En el comercio se dispone de kits para dichos sistemas de expresión. En la técnica se conocen bien y también se encuentran disponibles sistemas de expresión eucariotas para células de

mamífero, de levadura y de insecto. En una realización, el vector de expresión eucariota es un vector de adenovirus, un vector adenoasociado o un vector de retrovirus.

5 El promotor que se usa para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación particular. Opcionalmente, el promotor se coloca aproximadamente a la misma distancia del sitio de inicio de la transcripción heterólogo del que lo está del sitio de inicio de la transcripción en su entorno natural. Sin embargo, como se sabe en la técnica, puede ajustarse alguna variación en esta distancia sin pérdida de la función del promotor.

10 Además del promotor, el vector de expresión incluye típicamente una unidad de transcripción o un casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales necesarios para la expresión del Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante en células hospedadoras. Un casete de expresión típico por tanto contiene un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante y señales necesarias para la poliadenilación eficaz del transcrito, sitios de unión al ribosoma y terminación de la traducción. La secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor de Crecimiento de Fibroblastos está típicamente unida a una secuencia de péptido señal escindible que promueve la secreción del Factor de Crecimiento de Fibroblastos por la célula transformada. Dichos péptidos señal incluyen, entre otras cosas, péptidos señal del activador de plasminógeno tisular, insulina y factor de crecimiento neuronal, y esterasa de la hormona juvenil de *Heliothis virescens*. Elementos adicionales del casete pueden incluir potenciadores y, si se usa ADN genómico como el gen estructural, intrones con sitios donadores y aceptores de corte y empalme funcionales.

15 Además de una secuencia promotora, el casete de expresión también debe contener una región de terminación de la transcripción aguas abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación puede obtenerse del mismo gen que el de la secuencia promotora o puede obtenerse de genes diferentes.

20 El vector de expresión particular usado para transportar la información genética en la célula no es particularmente crítico. Puede usarse cualquiera de los vectores convencionales empleados para la expresión en células eucariotas o procariotas. Los vectores de expresión bacterianos convencionales incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D y sistemas de expresión de fusión tales como GST y LacZ. También pueden añadirse etiquetas epitópicas, p. ej., *c-myc*, a proteínas recombinantes para proporcionar procedimientos de aislamiento convenientes.

25 Los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas se usan típicamente en vectores de expresión eucariotas, por ejemplo, vectores SV40, vectores del virus del papiloma, y vectores procedentes del virus de Epstein-Barr. Otros ejemplos de vectores eucariotas incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV40, del promotor tardío de SV40, del promotor de metalotioneína, del promotor del virus del tumor mamario murino, del promotor del virus del sarcoma de Rous, del promotor de la polihedrina u otros promotores que muestran ser eficaces para la expresión en células eucariotas.

30 Algunos sistemas de expresión tienen marcadores que proporcionan amplificación génica tales como timidina quinasa, higromicina B fosfotransferasa y dihidrofolato reductasa. Como alternativa, también son adecuados sistemas de expresión a alto rendimiento que no implican amplificación génica, tales como un vector de baculovirus en células de insecto, con una secuencia de polinucleótidos que codifica el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante bajo la dirección del promotor de la polihedrina u otros promotores fuertes de baculovirus.

35 Los elementos que típicamente se incluyen en los vectores de expresión también incluyen un replicón que funciona en *E. coli*, un gen que codifica resistencia a antibióticos para permitir la selección de bacterias que alojan plásmidos recombinantes, y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias eucariotas. El gen de resistencia a antibióticos particular seleccionado no es crítico, cualquiera de los muchos genes de resistencia conocidos en la técnica son adecuados. Las secuencias procariotas se seleccionan opcionalmente de tal manera que no interfieran con la replicación del ADN en las células eucariotas, si fuera necesario. De manera similar a los marcadores de resistencia a antibióticos, también pueden usarse marcadores de selección metabólicos, que se basan en rutas metabólicas conocidas, como un medio para seleccionar células hospedadoras transformadas.

40 Cuando se desea la expresión periplasmática de una proteína recombinante (por ejemplo, un mutante de FGF de la presente invención), el vector de expresión comprende adicionalmente una secuencia que codifica una señal de secreción, tal como la señal de secreción OppA (Proteína Periplasmática de Unión a Oligopéptidos) de *E. coli* o una versión modificada de la misma, que se conecta directamente al extremo 5' de la secuencia codificante de la proteína que va a expresarse. Esta secuencia señal dirige la proteína recombinante producida en el citoplasma a través de la membrana celular al interior del espacio periplasmático. Adicionalmente el vector de expresión puede comprender una secuencia codificante para la peptidasa 1 señal, que es capaz de escindir enzimáticamente la secuencia señal cuando la proteína recombinante está entrando en el espacio periplasmático. Puede encontrarse una descripción más detallada de la producción periplasmática de una proteína recombinante, p. ej., en Gray y col., Gene 39: 247-254 (1985), Patentes de Estados Unidos n.º 6.160.089 y 6.436.674.

45 Como se ha analizado anteriormente, un experto en la técnica reconocerá que pueden realizarse diversas

sustituciones conservativas en cualquier Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre mutante o en su secuencia codificante conservando al mismo tiempo la actividad biológica del Factor de Crecimiento de Fibroblastos. Además, también pueden realizarse modificaciones de una secuencia codificante de polinucleótidos para adaptar un uso de codones preferido en un hospedador de expresión particular sin alterar la secuencia de aminoácidos resultante.

Procedimientos de transfección

Para producir líneas de células de bacterias, de mamífero, de levadura, de insecto o de plantas, que expresen grandes cantidades del Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, se usan procedimientos de transfección convencionales y después, la purificación se realiza con técnicas convencionales (véase, p. ej., Colley y col., J. Biol. Chem. 264: 17619-17622 (1989); Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). La transformación de células eucariotas y procariotas se realiza según técnicas convencionales (véase, p. ej., Morrison, J. Bact. 132: 349-351 (1977); Clark-Curtiss y Curtiss, Methods in Enzymology 101: 347-362 (Wu y col., eds, 1983).

Para introducir secuencias de nucleótidos exógenas en las células hospedadoras puede usarse cualquiera de los procedimientos bien conocidos. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmáticos, vectores de virus y cualquiera de los otros procedimientos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético, u otro material genético exógeno en una célula hospedadora (véase, p. ej., Sambrook y Russell, citados anteriormente). Solo es necesario que el procedimiento de modificación por ingeniería genética particular empleado pueda introducir satisfactoriamente al menos un gen en la célula hospedadora capaz de expresar el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante.

Detección de la expresión del FGF mutante en células hospedadoras

Después de introducir el vector de expresión en las células hospedadoras apropiadas, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión del Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante. Después, se explora la expresión del polipéptido recombinante en las células, que se recuperan posteriormente del cultivo usando técnicas convencionales (véase, p. ej., Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); la Patente de Estados Unidos n.º 4.673.641; Ausubel y col., citados anteriormente; y Sambrook y Russell, citados anteriormente)

Para explorar la expresión de genes existen diversos procedimientos generales muy conocidos entre los expertos en la técnica. En primer lugar, la expresión de genes puede detectarse a nivel de ácido nucleico. Normalmente se utilizan diversos procedimientos de medición específicos de ADN y ARN usando técnicas de hibridación de ácido nucleico (p. ej., Sambrook y Russell, citados anteriormente). Algunos procedimientos implican una separación electroforética (p. ej., transferencia de Southern para detectar ADN y transferencia de Northern para detectar ARN), pero la detección de ADN o ARN puede realizarse sin electroforesis también (tal como mediante transferencia puntual). La presencia de ácido nucleico que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante en células transfectadas también puede detectarse mediante PCR o RT-PCR usando cebadores específicos de secuencia.

En segundo lugar, la expresión de genes puede detectarse a nivel de polipéptido. Los expertos en la técnica utilizan diversos ensayos inmunológicos habituales para medir el nivel de un producto génico, particularmente usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reaccionan específicamente con un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención, tal como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, (p. ej., Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, capítulo 14, Cold Spring Harbor, 1988; Kohler y Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975)). Dichas técnicas requieren la preparación de anticuerpos seleccionando los que son muy específicos contra el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante o contra una parte antigénica del mismo. En la técnica están bien establecidos los procedimientos para generar anticuerpos policlonales y monoclonales y sus descripciones pueden encontrarse en la bibliografía, véase, p. ej., Harlow y Lane, citados anteriormente; Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 6: 511-519 (1976). En un apartado más adelante se proporcionan descripciones más detalladas de la preparación de anticuerpos contra el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención y de la realización de ensayos inmunológicos para detectar dicho factor.

Purificación del FGF mutante producido de manera recombinante

Una vez que la expresión de un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante recombinante se confirma en las células hospedadoras transfectadas, estas se cultivan después a una escala apropiada con la intención de purificar el polipéptido recombinante.

Purificación de bacterias del FGF mutante producido de manera recombinante

Cuando los Factores de Crecimiento de Fibroblastos mutantes de la presente invención se producen de manera recombinante por bacterias transformadas en grandes cantidades, típicamente después de la inducción del promotor, aunque la expresión puede ser constitutiva, las proteínas pueden formar agregados insolubles. Existen muchos protocolos adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión de proteínas. Por ejemplo, la purificación

de proteínas agregadas (en lo sucesivo en la presente memoria mencionado como cuerpos de inclusión) típicamente implica la extracción, separación y/o purificación de cuerpos de inclusión alterando células bacterianas, p. ej., mediante incubación en un tampón de aproximadamente 100-150 µg/ml de lisozima y Nonidet P40 al 0,1 %, un detergente no iónico. La suspensión celular puede triturarse usando un triturador Polytron (Brinkman Instruments, Westbury, NY). Como alternativa, las células pueden someterse a ultrasonido en hielo. En Ausubel y *col* y en Sambrook y Russell, ambos citados anteriormente, se describen procedimientos alternativos para efectuar la lisis de bacterias y dichos procedimientos serán obvios para los expertos en la técnica.

En general, la suspensión celular se centrifuga y el sedimento que contiene los cuerpos de inclusión se resuspende en tampón que no disuelve sino que lava los cuerpos de inclusión, p. ej., Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y Triton-X 100 al 2 %, un detergente no iónico. Puede ser necesario repetir la etapa de lavado para retirar tanto sedimento celular como sea posible. El sedimento de cuerpos de inclusión restante puede resuspenderse en un tampón apropiado (p. ej., fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM). Para los expertos en la técnica serán obvios otros tampones apropiados.

Después de la etapa de lavado, los cuerpos de inclusión se disuelven mediante la adición de un disolvente que es tanto un fuerte aceptor de hidrógeno como un fuerte donador de hidrógeno (o una combinación de disolventes teniendo cada uno estas propiedades). Las proteínas que formaron los cuerpos de inclusión pueden después renaturalizarse por dilución o diálisis con un tampón compatible. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, urea (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M), formamida (al menos aproximadamente 80 %, volumen/volumen de base) e hidrocloreuro de guanidina (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M). Algunos disolventes que pueden disolver proteínas formadoras de agregados, tales como SDS (dodecil sulfato sódico) y ácido fórmico al 70 %, pueden ser inapropiados para su uso en este procedimiento debido a la posibilidad de una desnaturalización irreversible de las proteínas, acompañado por una ausencia de inmunogenicidad y/o actividad. Aunque el hidrocloreuro de guanidina, y agentes similares, son desnaturalizantes, esta desnaturalización no es irreversible y la renaturalización puede producirse después de la retirada (por diálisis, por ejemplo) o dilución del desnaturalizante, lo que permite volver a formar la proteína de interés inmunológica y/o biológicamente activa. Después de la disolución, la proteína puede separarse de otras proteínas bacterianas mediante técnicas de separación convencionales. Para una descripción adicional sobre la purificación del Factor de Crecimiento de Fibroblastos recombinante de cuerpos de inclusión bacterianos, véase, p. ej., Patra y *col.*, Protein Expression and Purification 18: 182-190 (2000).

Como alternativa, es posible purificar polipéptidos recombinantes, p. ej., un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, del periplasma bacteriano. Cuando la proteína recombinante se exporta al interior del periplasma de la bacteria, la fracción periplasmática de la misma puede aislarse mediante choque osmótico en frío, además de mediante otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Ausubel y *col.*, citados anteriormente). Para aislar proteínas recombinantes del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un sedimento. El sedimento se resuspende en un tampón que contiene sacarosa al 20 %. Para efectuar la lisis de las células, las bacterias se centrifugan y el sedimento se resuspende en MgSO₄ 5 mM enfriado en hielo, y se mantiene en un baño con hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular se centrifuga y el sobrenadante se decanta y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante pueden separarse de las proteínas hospedadoras mediante técnicas de separación convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

Técnicas convencionales de separación de proteínas para purificación

Cuando un polipéptido recombinante, p. ej., el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención, se expresa en células hospedadoras en una forma soluble, su purificación puede ir seguida de un procedimiento de purificación de proteínas convencional descrito más adelante.

Fraccionamiento de la solubilidad

A menudo, como una etapa inicial, y si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento salino inicial puede separar muchas de las proteínas de las células hospedadoras no deseadas (o proteínas procedentes de los medios de cultivo celular) de la proteína recombinante de interés, p. ej., un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención. La sal preferida es sulfato de amonio. El sulfato de amonio precipita proteínas reduciendo de un modo eficaz la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. Después, las proteínas precipitan en función de su solubilidad. Cuanto más hidrófoba sea una proteína, más probable es que precipite a concentraciones más bajas de sulfato de amonio. Un protocolo típico es añadir sulfato de amonio saturado a una solución de proteínas de modo que la concentración de sulfato de amonio resultante sea entre 20-30 %. Este precipitará las proteínas más hidrófobas. El precipitado se desecha (a menos que la proteína de interés sea hidrófoba) y el sulfato de amonio se añade al sobrenadante a una concentración que se sabe que precipita la proteína de interés. Después, el precipitado se disuelve en tampón y el exceso de sal se retira, si es necesario, a través de diálisis o diafiltración. Otros procedimientos que se basan en la solubilidad de las proteínas, tales como precipitación con etanol frío, son muy conocidos por los expertos en la técnica y se pueden usar para fraccionar mezclas complejas de proteínas.

Filtración diferencial por tamaño

Basándose en un peso molecular calculado, una proteína de mayor y menor tamaño puede aislarse con ultrafiltración a través de membranas de diferentes tamaños de poro (por ejemplo, membranas Amicon o Millipore). Como una primera etapa, la mezcla de proteínas se ultrafiltra a través de una membrana que tiene un tamaño de poro que tiene un límite de peso molecular inferior que el peso molecular de una proteína de interés, p. ej., un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante. Después, el material retenido de la ultrafiltración se ultrafiltra frente a una membrana con un límite de peso molecular mayor que el peso molecular de la proteína de interés. La proteína recombinante atravesará la membrana en el material filtrado. Después, el material filtrado puede cromatografiarse como se describe más adelante.

Cromatografía en columna

- 10 Las proteínas de interés (tal como el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención) también pueden separarse de otras proteínas en función de su tamaño, carga superficial neta, hidrofobicidad o afinidad por los ligandos. Además, los anticuerpos suscitados contra el Factor de Crecimiento de Fibroblastos pueden conjugarse con matrices de columna y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos inmunopurificado. Todos estos procedimientos son muy conocidos en la técnica.
- 15 Para un experto será obvio que las técnicas de cromatografía pueden realizarse a cualquier escala y usando equipos de muchos fabricantes diferentes (p. ej., Pharmacia Biotech).

Inmunoensayos para la detección de la expresión del FGF mutante

Para confirmar la producción de un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante recombinante, los ensayos inmunológicos pueden ser útiles para detectar en una muestra la expresión del polipéptido. Los ensayos inmunológicos son también útiles para cuantificar el nivel de expresión de la hormona recombinante. Para llevar a cabo estos ensayos inmunológicos se requieren anticuerpos contra un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante.

Producción de anticuerpos contra el FGF mutante

Los expertos en la técnica conocen procedimientos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con un inmunógeno de interés (véase, p. ej., Coligan, *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY, 1991; Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY, 1989; Stites y col. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas en su interior; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY, 1986; y Kohler y Milstein *Nature* 256: 495-497, 1975). Dichas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos por selección de los mismos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores de fagos o similares (véase, Huse y col., *Science* 246: 1275-1281, 1989; y Ward y col., *Nature* 341: 544-546, 1989).

Para producir antisueros que contengan anticuerpos con especificidad deseada, el polipéptido de interés (p. ej., un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención) o un fragmento antigénico del mismo, puede usarse para inmunizar animales adecuados, p. ej., ratones, conejos o primates). Puede usarse un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund, según un protocolo de inmunización convencional. Como alternativa, puede conjugarse un péptido antigénico sintético derivado de un polipéptido particular con una proteína transportadora y posteriormente usarse como un inmunógeno.

La respuesta inmunitaria del animal contra la preparación inmunogénica se controla con análisis de sangre y determinando el título de reactividad contra el antígeno de interés. Cuando se obtienen títulos apropiadamente altos de anticuerpos contra el antígeno, se extrae sangre del animal y se preparan antisueros. Después, puede realizarse un fraccionamiento adicional de los antisueros para enriquecer anticuerpos específicamente reactivos contra el antígeno y la purificación de los anticuerpos, véase, Harlow y Lane, citados anteriormente, y las descripciones generales de purificación de proteínas proporcionadas anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen usando diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Típicamente, los esplenocitos de un animal inmunizado con un antígeno deseado, se immortalizan normalmente mediante fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519, 1976). Los procedimientos alternativos de immortalización incluyen, p. ej., la transformación con el Virus del Epstein Barr, oncogenes o retrovirus u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Las colonias que surgen de las células immortalizadas sencillas se exploran con respecto a la producción de anticuerpos con especificidad y afinidad deseadas para el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede potenciarse mediante diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado.

Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales también pueden producirse de manera recombinante después de la identificación de las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo con especificidad deseada, o un fragmento de unión de dicho anticuerpo, explorando una biblioteca de ADNc de linfocitos B humanos según el protocolo general diseñado por Huse y col., citados anteriormente. Los principios y procedimientos generales de la producción de polipéptidos recombinantes analizados anteriormente pueden aplicarse para la producción de anticuerpos mediante procedimientos recombinantes.

- 5 Cuando se desee, los anticuerpos que pueden reconocer específicamente un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención, pueden ensayarse con respecto a su reactividad cruzada contra el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre y por tanto diferenciarse de los anticuerpos contra la proteína de tipo silvestre. Por ejemplo, los antisueros obtenidos de un animal inmunizado con un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante pueden procesarse a través de una columna sobre la que se inmoviliza un Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre. La parte de los antisueros que pasa a través de la columna reconoce solo el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante y no el de tipo silvestre. De manera similar, los anticuerpos monoclonales contra un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante también pueden explorarse con respecto a su exclusividad en reconocer solo al Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante y no al de tipo silvestre.
- 10 Los anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente solo el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención pero no el de tipo silvestre, son útiles para aislar la proteína mutante de la proteína de tipo silvestre, por ejemplo, incubando una muestra con un anticuerpo monoclonal o policlonal específico del Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante inmovilizado sobre un soporte sólido.

Inmunoensayos para detectar la expresión del FGF mutante

- 15 Una vez disponibles los anticuerpos específicos para un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la presente invención, la cantidad de polipéptido en una muestra, p. ej., en un lisado celular, puede medirse mediante diversos procedimientos de inmunoensayo proporcionando resultados cualitativos y cuantitativos a un experto en la técnica. Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayos en general, véase, p. ej., Stites, citado anteriormente; las Patentes de Estados Unidos n.º 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288 y 4.837.168.

20 Glucosilación y glucoconjugación del FGF mutante

Glucosilación y glucoconjugación mediante procedimientos enzimáticos

- 25 La modificación de los polipéptidos después de la expresión *in vitro* es una estrategia atractiva para remediar las deficiencias de los procedimientos que se basan en el control de la glucosilación mediante sistemas de expresión por modificación con ingeniería genética, incluyendo tanto la modificación de estructuras de glucano como la introducción de glucanos en nuevos sitios. Se está llegando a disponer de un arsenal completo de enzimas que transfieren residuos donadores de sacáridos, generando síntesis enzimática *in vitro* de glucoconjugados con patrones de glucosilación diseñados a medida y posibles estructuras de glucosilo. Véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos n.º 5.876.980; 6.030.815; 5.728.554; 5.922.577; y las solicitudes de patente publicadas WO 98/31826; WO 01/88117; WO 03/031464; WO 03/046150; WO 03/045980; WO 03/093448; WO 04/009838; 30 US2002/142370; US2003/040037; US2003/180835; US2004/063911; US2003/207406; y US2003/124645, cada una de ellas incorporada en la presente memoria por referencia.

- 35 La invención proporciona procedimientos para producir conjugados de factores de crecimiento de fibroblastos mutantes glucosilados y no glucosilados, que tienen sitios de glucosilación que no existen en el FGF de tipo silvestre correspondiente. Dicha conjugación puede realizarse directamente en las unidades de azúcar apropiadas de un FGF mutante glucosilado, o después de la retirada (es decir, "recorte") de cualquiera de las unidades de azúcar no deseadas. Los conjugados se forman entre péptidos y especies diversas, tales como polímeros solubles en agua, residuos terapéuticos, residuos de diagnóstico, residuos diana y similares. También se proporcionan conjugados que incluyen dos o más péptidos unidos entre sí a través de un brazo enlazador, es decir, conjugados multifuncionales. Los conjugados multifuncionales de la invención pueden incluir dos o más copias del mismo péptido o de un 40 conjunto de diversos péptidos con diferentes estructuras, y/o propiedades.

- 45 Los conjugados de la invención se forman a través de la unión enzimática de un azúcar modificado con el péptido glucosilado o no glucosilado. Cuando el azúcar modificado, se interpone entre el péptido y el grupo modificador en el azúcar, se convierte en lo que en la presente memoria se denomina "grupo de unión a glucosilo intacto". Usando la selectividad exquisita de las enzimas, tales como glucosiltransferasas, el presente procedimiento proporciona péptidos que llevan un grupo deseado en uno o más lugares específicos. Por tanto, según la presente invención, un azúcar modificado se une directamente a un lugar seleccionado en la cadena peptídica o, como alternativa, el azúcar modificado se agrega sobre un residuo de hidrato de carbono de un glucopeptido. Los péptidos en los que se unen los azúcares modificados tanto a un hidrato de carbono glucopeptídico como directamente a un resto de aminoácido de la estructura peptídica también están dentro del alcance de la presente invención.

- 50 A diferencia de las estrategias de elaboración de péptidos, químicas y enzimáticas, los procedimientos de la invención hacen posible ensamblar péptidos y glucopeptidos que tienen un patrón de derivación sustancialmente homogéneo; las enzimas que se usan en la invención son, en general, selectivas para un resto de aminoácido concreto o para una combinación de restos de aminoácido del péptido. Los procedimientos son también prácticos para la producción a gran escala de péptidos y glucopeptidos modificados. Por tanto, los procedimientos de la 55 invención proporcionan un medio práctico para la preparación a gran escala de glucopeptidos que tienen patrones de derivatización uniformes preseleccionados. Los procedimientos son particularmente muy adecuados para la modificación de péptidos terapéuticos, incluyendo, aunque sin limitación, glucopeptidos que están incompletamente glucosilados durante la producción en células en cultivo celular (por ejemplo, células de mamífero, células de

insecto, células vegetales, células fúngicas, células de levaduras o células procariotas) o en plantas o animales transgénicos.

Los procedimientos de la invención también proporcionan conjugados de péptidos glucosilados y no glucosilados con semivida terapéutica aumentada debido, por ejemplo, a una tasa de eliminación reducida, o a una tasa de captación reducida por el sistema inmunitario o reticuloendotelial (RES). Además, los procedimientos de la invención proporcionan un medio para enmascarar determinantes antigénicos en péptidos, de modo que se reduce o se elimina una respuesta inmunitaria del hospedador contra el péptido. La unión selectiva de agentes diana también se puede usar para dirigir un péptido a un tejido concreto o a un receptor de superficie celular que sea específico para el agente diana concreto.

10 Conjugados peptídicos

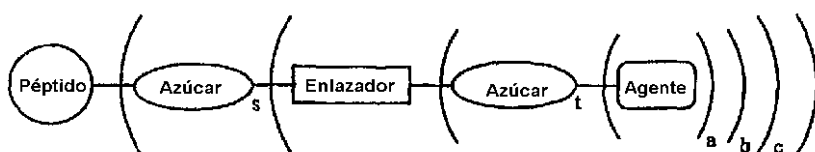
En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un azúcar modificado y un péptido de FGF. En estos casos el péptido de FGF puede tener la misma secuencia que la de un péptido de tipo silvestre, o puede ser un péptido mutante. Un conjugado peptídico puede tener una de diversas formas. En un ejemplo de realización, un conjugado peptídico puede comprender un péptido de FGF y un grupo modificador unido a un aminoácido del péptido a través de un grupo de enlace glucosilo.

En otro ejemplo de realización, un conjugado peptídico del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) puede comprender un péptido de FGF y un grupo glucosilo unido a un resto de aminoácido del péptido de FGF. En otro ejemplo de realización, el péptido de FGF es un miembro seleccionado de FGF-1, FGF-2, FGF-9, FGF-18, FGF-20 y FGF-21. En otro ejemplo de realización, el péptido de FGF comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es un miembro seleccionado de las SEQ ID NO: 1, 9-14, 18-45, 48-65, 69-109, 112-145 y 146.

En un ejemplo de realización, el grupo glucosilo es un grupo de unión a glucosilo intacto. En otro ejemplo de realización, el grupo glucosilo comprende adicionalmente un grupo modificador. En otro ejemplo de realización, el grupo modificador es un grupo modificador no glucosídico. En otro ejemplo de realización, el grupo modificador no incluye un residuo sacárido de origen natural.

En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico puede comprender un péptido de FGF y un grupo de unión a glucosilo que está unido tanto al hidrato de carbono glucopeptídico como directamente a un resto de aminoácido de la estructura peptídica. En otra realización más a modo de ejemplo, un conjugado peptídico puede comprender un péptido de FGF y un grupo modificador unido directamente a un resto de aminoácido del péptido. En esta realización, el conjugado peptídico puede no comprender un grupo glucosilo. En cualquiera de estas realizaciones, el péptido de FGF puede estar o no glucosilado. La presente invención también incluye un procedimiento para la modificación de la estructura de glucano en el FGF, proporcionando un conjugado entre el FGF y un grupo modificador.

Los conjugados de la invención corresponderán típicamente a la estructura general:



donde los símbolos a, b, c, d y s representan un número entero positivo distinto de cero; y t es 0 o un número entero positivo. El "agente" es un agente terapéutico, un agente bioactivo, un marcador detectable, un residuo soluble en agua (por ejemplo, PEG, m-PEG, PPG y m-PPG) o similares. El "agente" puede ser un péptido, por ejemplo, una enzima, un anticuerpo, un antígeno, etc. El enlazador puede ser cualquiera de una amplia serie de grupos enlazadores, ver más adelante. Como alternativa, el enlazador puede ser un enlace sencillo o un "enlazador de orden cero".

En el siguiente análisis, la invención se ilustra con referencia al uso de péptidos de FGF seleccionados, tales como FGF-20 y FGF-21. Los expertos en la técnica reconocerán que el centro del análisis es para aclarar la ilustración y que para formar estos conjugados puede usarse cualquier péptido de FGF, bien de tipo silvestre o mutante.

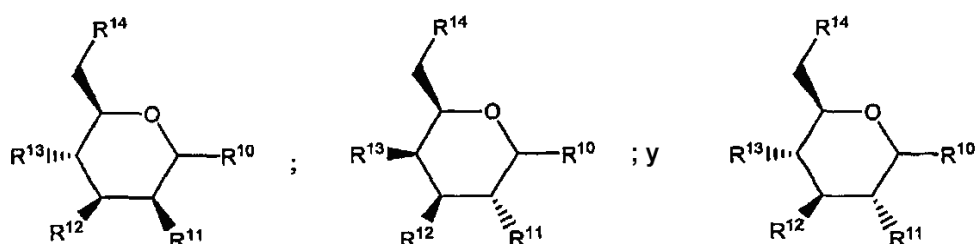
Azúcar modificado

En una realización ejemplar, los péptidos de la invención se hacen reaccionar con un azúcar modificado, formando de este modo un conjugado peptídico. Un azúcar modificado comprende un "residuo donante de azúcar", así como un "residuo de transferencia de azúcar". El residuo donante de azúcar es cualquier porción del azúcar modificado que se unirá al péptido, a través de un residuo glucosilo o residuo aminoacídico, como un conjugado de la invención. El residuo donante de azúcar incluye aquellos átomos que están alterados químicamente durante su conversión del azúcar modificado al grupo de unión a glucosilo del conjugado peptídico. El residuo de transferencia de azúcar es cualquier porción del azúcar modificado que no estará unida al péptido como un conjugado de la invención. Por

ejemplo, un azúcar modificado de la invención es el nucleótido de azúcar PEGilado, CMP-SA-PEG. Para CMP-SA-PEG, el residuo donante de azúcar, o residuo donante de PEG-sialilo, comprende ácido PEG-siálico, mientras que el residuo de transferencia de azúcar, o residuo de transferencia de sialilo, comprende CMP.

5 En los azúcares modificados de uso en la invención, el residuo sacarilo es preferiblemente un sacárido, un desoxi-sacárido, un amino-sacárido, o un N-acil sacárido. El término "sacárido", y sus equivalentes, "sacarilo", "azúcar" y "glucosilo" se refieren a monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros. El residuo de azúcar también se funcionaliza con un grupo de modificación. El grupo de modificación se conjuga con el residuo sacarilo, típicamente, a través de conjugación con una amina, sulfhidrilo o hidroxilo, por ejemplo, hidroxilo primario, residuo en el azúcar. En una
10 realización ejemplar, el grupo de modificación está unido a través de un residuo amina en el azúcar, por ejemplo, a través de una amida, un uretano o una urea que se forma a través de la reacción de la amina con un derivado reactivo del grupo de modificación.

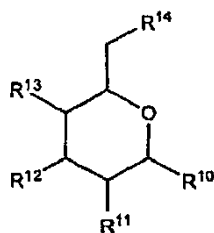
Puede utilizarse cualquier residuo sacarilo como el residuo donante de azúcar del azúcar modificado. El residuo sacarilo puede ser un azúcar conocido, tal como manosa, galactosa o glucosa, o una especie que tiene la estereoquímica de un azúcar conocido. Las fórmulas generales de estos azúcares modificados son:



Otros residuos sacarilo que son útiles en la formación de las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, fucosa y ácido siálico, así como aminoazúcares tales como glucosamina, galactosamina, mannosamina, el análogo 5-amina de ácido siálico, y similares. El residuo sacarilo puede ser una estructura encontrada en la naturaleza o puede modificarse para proporcionar un sitio para conjugar el grupo de modificación. Por ejemplo, en una realización, el azúcar modificado proporciona un derivado de ácido siálico, en el que el residuo 9-hidroxi se reemplaza con una amina. La amina se deriva fácilmente con un análogo activado de un grupo de modificación
20 seleccionado.

Los ejemplos de azúcares modificados de uso en la invención se describen en la Solicitud de Patente PCT n.º PCT/US05/002522, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

25 En una realización ejemplar adicional, la invención utiliza azúcares modificados en los que la posición de 6-hidroxilo se convierte en el residuo amina correspondiente, que lleva un casete de un grupo de modificación de enlazador tal como se ha expuesto anteriormente. Los grupos glucosilo ejemplares que pueden usarse como el núcleo de estos azúcares modificados incluyen Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Xilo, Man, y similares. Un azúcar modificado representativo de acuerdo con esta realización tiene la fórmula:



en la que R¹¹-R¹⁴ son miembros independientemente seleccionados de H, OH, C(O)CH₃, NH, y NH C(O)CH₃, R¹⁰ es un enlace a otro resto glucosilo (-O-glicosilo) o a un aminoácido del péptido de Factor VII y/o Factor VIIa (-NH-(Factor VII y/o Factor VIIa)). R¹⁴ es OR¹, NHR¹ o NH-L-R¹. R¹ y NH-L-R¹ son como se ha descrito anteriormente.

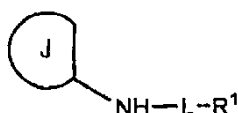
Grupos de unión a glucosilo

35 En una realización ejemplar, la invención proporciona un conjugado peptídico formado entre un azúcar modificado de la invención y un péptido FGF. En esta realización, el residuo donante de azúcar (tal como el residuo sacarilo y el grupo de modificación) del azúcar modificado se convierte en un "grupos de unión a glucosilo". Como alternativa, el "grupo de unión a glucosilo" puede referirse al residuo glucosilo que se interpone entre el péptido y el grupo de modificación.

40 Debido a la versatilidad de los procedimientos disponibles para añadir y/o modificar restos glucosilo en un péptido, los grupos de unión a glucosilo pueden tener sustancialmente cualquier estructura. En el análisis a continuación, la invención se ilustra por referencia al uso de derivados seleccionado de furanosa y piranosa. Los expertos en la

técnica reconocerán que el foco del análisis tiene fines de claridad de ilustración y que las estructuras y composiciones que se exponen pueden aplicarse generalmente a todo el género de grupos de unión a glucosilo y azúcares modificados. El grupo de unión a glucosilo puede comprender virtualmente cualquier mono- u oligo-sacárido. Los grupos de unión a glucosilo pueden unirse a un aminoácido a través de la cadena lateral o a través de la estructura del péptido. Como alternativa, los grupos de unión a glucosilo pueden unirse al péptido a través de un residuo sacarilo. Este residuo sacarilo puede ser una porción de una estructura de glicano unida a O o unida a N en el péptido.

En una realización ejemplar, la invención utiliza un grupo de unión a glucosilo que tiene la fórmula:



en la que J es un residuo glucosilo, L es un enlace o un enlazador y R¹ es un grupo de modificación, por ejemplo, un grupo de modificación polimérico. Los enlaces ejemplares son aquellos que se forman entre un residuo NH₂ en el residuo glucosilo y un grupo de reactividad complementaria en el grupo de modificación. Por ejemplo, cuando R¹ incluye un residuo de ácido carboxílico, este residuo puede activarse y acoplarse con el residuo NH₂ en el resto glucosilo proporcionando un enlace que tiene la estructura NHC(O)R¹. J es preferiblemente un residuo glucosilo que está "intacto", que no se ha degradado por la exposición a condiciones que escinden la estructura de piranosa o furanosa, por ejemplo, condiciones oxidativas, por ejemplo, peryodato sódico.

Los enlazadores ejemplares incluyen residuos alquilo y heteroalquilo. Los enlazadores incluyen grupos de unión, por ejemplo grupos de unión basados en acilo, por ejemplo, -C(O)NH-, -OC(O)NH-, y similares. Los grupos de unión son enlaces formados entre componentes de las especies de la invención, por ejemplo, entre el residuo glucosilo y el enlazador (L), o entre el enlazador y el grupo de modificación (R¹). Otros grupos de unión ejemplares son éteres, tioéteres y aminas. Por ejemplo, en una realización, el enlazador es un resto aminoacídico, tal como un resto glicina. El residuo ácido carboxílico de la glicina se convierte en la amida correspondiente por reacción con una amina en el resto glucosilo, y la amina de la glicina se convierte en la amida o uretano correspondiente por reacción con un ácido carboxílico o carbonato activado del grupo de modificación.

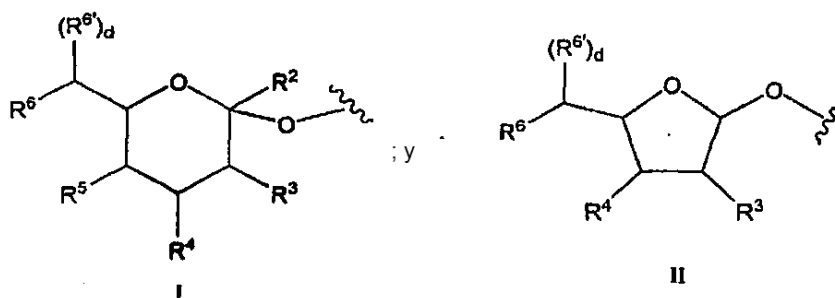
Una especie ejemplar de NH-L-R¹ tiene la fórmula: -NH{C(O)(CH₂)_aNH}_s{C(O)(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNH}_tR¹, en la que los índices s y t son independientemente 0 o 1. Los índices a, b y d son independientemente números enteros de 0 a 20, y c es un número entero de 1 a 2500. Otros enlazadores similares se basan en especies en las que un residuo -NH se reemplaza por otro grupo, por ejemplo, -S, -O o -CH₂. Como los expertos en la técnica apreciarán, uno o más de los residuos entre corchetes correspondientes a los índices s y t pueden reemplazarse con un residuo alquilo o heteroalquilo sustituido o sin sustituir.

Más particularmente, la invención utiliza compuestos en los que NH-L-R¹ es: NHC(O)(CH₂)_aNHC(O)(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNHR¹, NHC(O)(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNHR¹, NHC(O)O(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNHR¹, NH(CH₂)_aNHC(O)(CH₂)_b(OCH₂CH₂)_cO(CH₂)_dNHR¹, NHC(O)(CH₂)_aNHR¹, NH(CH₂)_aNHR¹, y NHR¹. En estas fórmulas, los índices a, b y d se seleccionan independientemente de los números enteros de 0 a 20, preferiblemente de 1 a 5. El índice c es un número entero de 1 a aproximadamente 2500.

En una realización ejemplar, c se selecciona de tal forma que el residuo PEG es aproximadamente de 1 kD, 5 kD, 10, kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 35 kD, 40 kD, 45 kD, 50 kD, 55 kD, 60 kD o 65 kD.

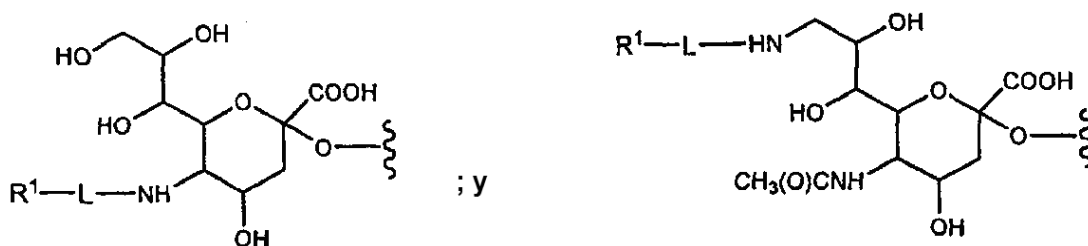
Para los propósitos de comodidad, los grupos de unión a glucosilo en el resto de esta sección se basarán en un residuo sialilo. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que puede usarse otro residuo glucosilo, tal como manosilo, galactosilo, glucosilo, o fucosilo, en lugar del residuo sialilo.

En una realización ejemplar, el grupo de unión a glucosilo es un grupo de unión a glucosilo intacto, en el que el residuo o residuos glucosilo que forman el grupo de unión no se degradan por procesos químicos (por ejemplo, metaperyodato sódico) o enzimáticos (por ejemplo, oxidasa). Los conjugados seleccionados de la invención incluyen un grupo de modificación que está unido al residuo amina de un amino-sacárido, por ejemplo, mannosamina, glucosamina, galactosamina, ácido siálico, etc. En una realización ejemplar, la invención proporciona un conjugado peptídico que emprende un grupo de unión a glucosilo intacto que tiene una fórmula que se selecciona entre:



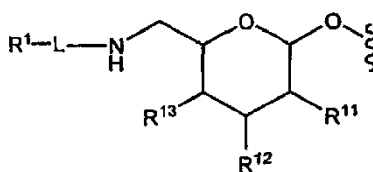
En las Fórmulas I, R^2 es H, CH_2OR^7 , $COOR^7$ u OR^7 , en la que R^7 representa H, alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir. Cuando $COOR^7$ es un ácido carboxílico o carboxilato, ambas formas se representan por la designación de la estructura individual COO^- o $COOH$. En las Fórmulas I y II, los símbolos R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y R^6 representan independientemente H, alquilo sustituido o sin sustituir, OR^8 , $NHC(O)R^9$. El índice d es 0 o 1, R^8 y R^9 se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, ácido siálico o ácido polisíalico. Al menos uno de R^3 , R^4 , R^5 , R^6 o R^6 incluye un grupo de modificación. Este grupo de modificación puede ser un residuo de modificación polimérico, por ejemplo, PEG, unido a través de un enlace o un grupo de unión. En una realización ejemplar, R^6 y R^6 , junto con el carbono al que están unidos son componentes de la cadena lateral piruvilo de ácido siálico. En una realización ejemplar adicional, la cadena lateral piruvilo se funcionaliza con el grupo de modificación polimérico. En otra realización ejemplar, R^6 y R^6 , junto con el carbono al que están unidos son componentes de la cadena lateral de ácido siálico y el grupo de modificación polimérico es un componente de R^5 .

Los casetes del grupo de unión a glucosilo intacto del grupo de modificación ejemplares de acuerdo con este motivo se basan en una estructura de ácido siálico, tal como los que tienen las fórmulas:



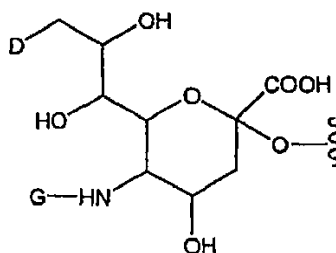
En las fórmulas anteriores, R^1 y L son como se ha descrito anteriormente. A continuación, se proporciona un detalle adicional sobre la estructura de los grupos R^1 ejemplares.

En una realización ejemplar adicional más, el conjugado se forma entre un péptido y un azúcar modificado en el que el grupo de modificación está unido a través de un enlazador en la posición 6 del carbono del azúcar modificado. Por lo tanto, los grupos de unión a glucosilo ilustrativos de acuerdo con esta realización tienen la fórmula:



en la que los radicales son como se ha analizado anteriormente. Los grupos de unión a glucosilo incluyen, sin limitación, glucosa, glucosamina, N-acetil-glucosamina, galactosa, galactosamina, N-acetilgalactosamina, mannososa, mannosamina, N-acetil-mannosamina, y similares.

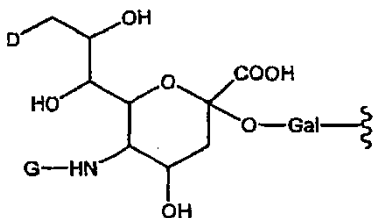
En una realización, la presente invención proporciona un conjugado peptídico que comprende el siguiente grupo de unión a glucosilo:



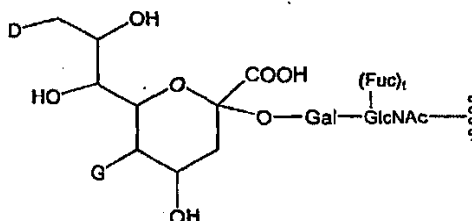
en donde D es un miembro seleccionado de -OH y R¹-L-NH-; G es un miembro seleccionado de H y R¹-L- y -C(O)alquilo (C₁-C₆); R¹ es un residuo que comprende un resto de poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada; y L es un enlazador, por ejemplo, un enlace ("orden cero"), alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir. En realizaciones ejemplares, cuando D es OH, G es R¹-L-, y cuando G es -C(O)alquilo (C₁-C₆), D es R¹-L-NH-.

5

La invención proporciona un conjugado peptídico que incluye un grupo de unión a glucosilo que tiene la fórmula:

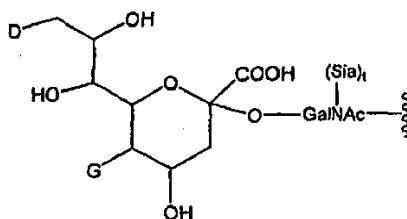


En otras realizaciones, el grupo de unión a glucosilo tiene la fórmula:



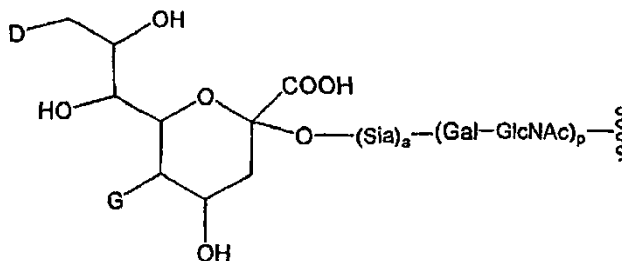
10 en la que el índice t es 0 o 1.

En una realización ejemplar adicional más, el grupo de unión a glucosilo tiene la fórmula:



en la que el índice t es 0 o 1.

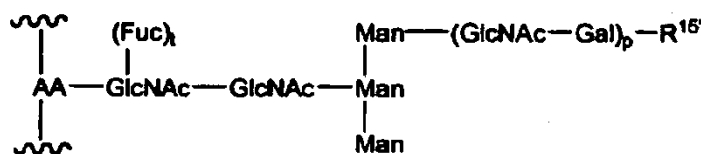
En otra realización más, el grupo de unión a glucosilo tiene la fórmula:

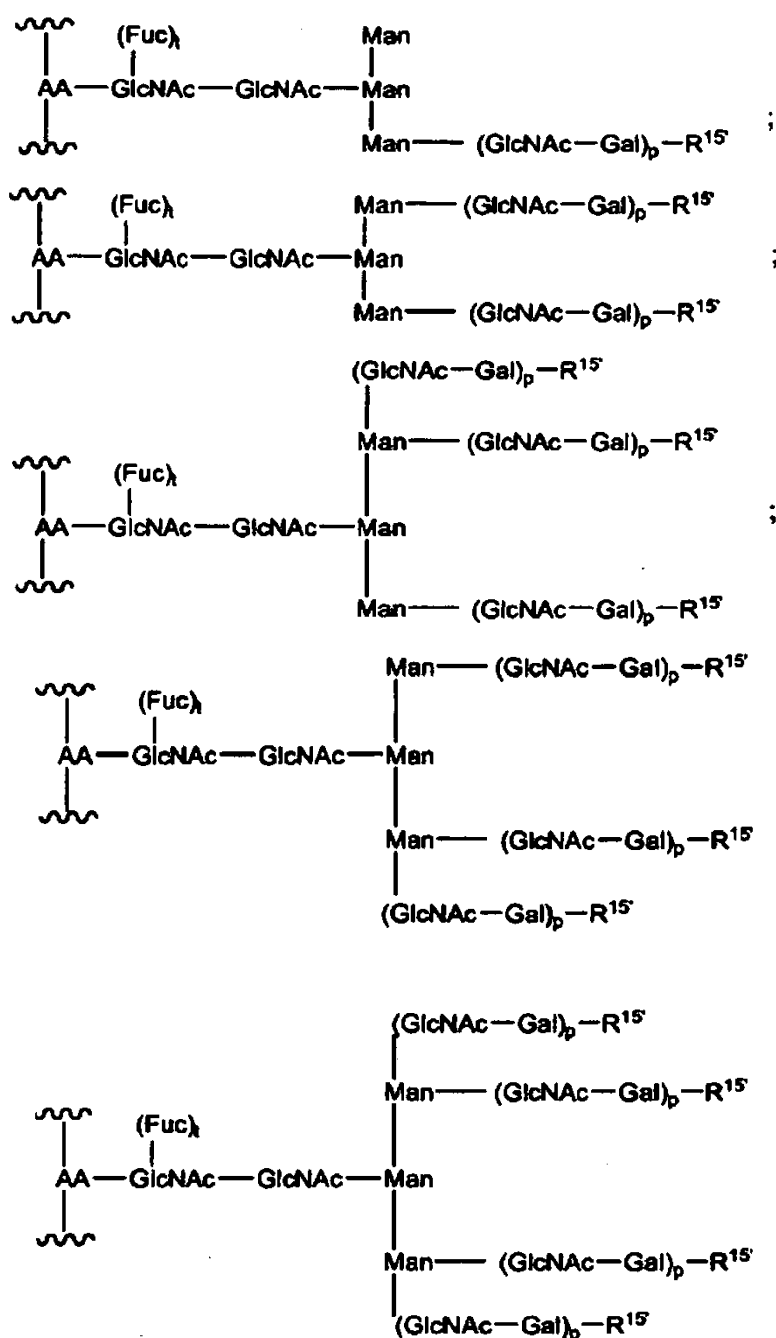


15

en la que el índice p representa un número entero de 1 a 10; y a es 0 o 1.

En una realización ejemplar, un conjugado peptídico glicoPEGilado de la invención se selecciona de las fórmulas expuestas a continuación:





5

;y

10

15

En las fórmulas anteriores, el índice t es un número entero de 0 a 1 y el índice p es un número entero de 1 a 10. El símbolo R¹⁵ representa H, OH (por ejemplo, Gal-OH), un residuo sialilo, un grupo de unión a sialilo (es decir, grupo de modificación polimérico del grupo de unión a sialilo (Sia-L-R¹), o un residuo sialilo al que está unido un residuo sialilo modificado por polímero (por ejemplo, Sia-Sia-L-R¹) ("Sia-Sia^{pm}"). Los residuos sacarilo modificados con polímero ejemplares tienen una estructura de acuerdo con las Fórmulas I y II. Un conjugado peptídico ejemplar de la invención incluirá al menos un glicano que tiene un R¹⁵ que incluye una estructura de acuerdo con las Fórmulas I o II. El oxígeno, con la valencia abierta, de las Fórmulas I y II se une preferiblemente a través de una unión glucosídica a un carbono de un residuo Gal o GalNAc. En una realización ejemplar, el oxígeno está unido al carbono en la posición 3 de un residuo galactosa. En otra realización ejemplar, el ácido siálico modificado está α2,3 unido al residuo galactosa. En otra realización ejemplar, el ácido siálico está α2,6 unido al residuo galactosa.

En una realización ejemplar, el grupo de unión a sialilo es un residuo sialilo al que se une un residuo sialilo modificado por polímero (por ejemplo, Sia-Sia-L-R¹) ("Sia-Sia^{pm}"). Aquí, el grupo de unión a glucosilo se une a un residuo galactosilo a través de un residuo sialilo:

5 En una realización ejemplar, el grupo de unión a glucosilo es un linear PEG-sialilo de 10 kDa lineal, y uno o dos de estos grupos de unión a glucosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización ejemplar, el grupo de unión a glucosilo es un PEG-sialilo de 20 kDa lineal, y uno o dos de estos grupos de unión a glucosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización ejemplar, el grupo de unión a glucosilo es un PEG-sialilo de 5 kDa lineal, y uno, dos o tres de estos grupos de unión a glucosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización ejemplar, el grupo de unión a glucosilo es un PEG-sialilo de 40 kDa lineal, y uno o dos de estos grupos de unión a glucosilo se unen covalentemente al péptido.

Grupos de modificación

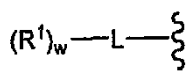
10 Los conjugados peptídicos de la invención comprenden un grupo de modificación. Este grupo puede estar unido covalentemente a un péptido FGF a través de un aminoácido o un grupo de unión a glucosilo. Los "grupos de modificación" pueden incluir una diversidad de estructuras que incluyen residuos diana, residuos terapéuticos, biomoléculas. Además, los "grupos de modificación" incluyen grupos de modificación poliméricos, que son polímeros que pueden alterar una propiedad del péptido, tal como su biodisponibilidad o su semivida en el cuerpo.

15 En una realización ejemplar, el grupo de modificación es un agente diana que localiza selectivamente un tejido particular debido a la presencia de un agente diana como un componente del conjugado. En una realización ejemplar, el agente diana es una proteína. Las proteínas ejemplares incluyen transferrina (cerebro, acervo de sangre), HS-glicoproteína (hueso, cerebro, acervo de sangre), anticuerpos (cerebro, tejido con antígeno específico de anticuerpo, acervo de sangre), factores de coagulación V-XII (tejido dañado, coágulos, cáncer, acervo de sangre), proteínas en suero, por ejemplo, glicoproteína de α -ácido, fetuina, proteína α -fetal (cerebro, acervo de sangre),
 20 glicoproteína β 2 (hígado, placas de aterosclerosis, cerebro, acervo de sangre), G-CSF, GM-CSF, M-CSF y EPO (estimulación inmune, cánceres, acervo de sangre, sobreproducción de glóbulos rojos, neuroprotección), albúmina (aumento en semivida), y lipoproteína E.

25 Para los propósitos de comodidad, los grupos de modificación en el resto de esta sección se basarán en gran medida en grupos de modificación poliméricos, tales como polímeros solubles en agua e insolubles en agua. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que pueden usarse otros grupos de modificación, tales como residuos diana, residuos terapéuticos y biomoléculas, en lugar de los grupos de modificación poliméricos.

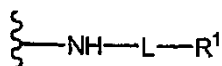
Enlazadores de los grupos de modificación

30 Los enlazadores del grupo de modificación sirven para unir el grupo de modificación (es decir, los grupos de modificación poliméricos, residuos diana, residuos terapéuticos y biomoléculas) al péptido. En una realización ejemplar, el grupo de modificación polimérico está unido a un grupo de unión a glucosilo, generalmente a través de un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, en el núcleo a través de un enlazador, L, como se muestra a continuación:

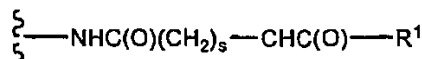


35 R^1 es el residuo polimérico y L se selecciona de un enlace y un grupo de unión. El índice w representa un número entero seleccionado de 1-6, preferiblemente 1-3 y más preferiblemente 1-2. Los grupos de unión ejemplares incluyen residuos alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y ácido siálico. Un componente ejemplar del enlazador es un residuo acilo.

Un compuesto ejemplar de acuerdo con la invención tiene una estructura de acuerdo con las Fórmulas I o II anteriores, en las que al menos uno de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 o R^6 tiene la fórmula:

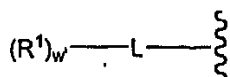


40 En otro ejemplo de acuerdo con esta realización, al menos uno de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 o R^6 tiene la fórmula:



en la que s es un número entero de 0 a 20 y R^1 es un residuo de modificación polimérico lineal.

45 En una realización ejemplar, la construcción grupo de modificación polimérico-enlazador es una estructura ramificada que incluye dos o más cadenas poliméricas unidas al residuo central. En esta realización, la construcción tiene la fórmula:



en la que R^1 y L son como se han analizado anteriormente y w' es un número entero de 2 a 6, preferiblemente de 2 a

4 y más preferiblemente de 2 a 3.

5 Cuando L es un enlace, se forma entre un grupo funcional reactivo en un precursor de R¹ y un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en el núcleo sacarilo. Cuando L es un enlazador de orden distinto a cero, un precursor de L puede estar en su lugar en el residuo glucosilo antes de la reacción con el precursor R¹. Como alternativa, los precursores de R¹ y L pueden incorporarse en un casete preformado que se une posteriormente al residuo glucosilo. Como se expone en el presente documento, la selección y la preparación de precursores con los grupos funcionales reactivos apropiado está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Además, el acoplamiento de los precursores procede según la química que se entiende bien en la técnica.

10 En una realización ejemplar, L es un grupo de unión que se forma a partir de un aminoácido, o péptido pequeño (por ejemplo, 1-4 restos aminoácidos) proporcionan un azúcar modificado en el que el grupo de modificación polimérico está unido a través de un enlazador alquilo sustituido. Los enlazadores ejemplares incluyen glicina, lisina, serina y cisteína. El residuo PEG puede estar unido al residuo amina del enlazador a través de un enlace amida o uretano. El PEG está unido a los átomos de azufre u oxígeno de cisteína y serina a través de enlaces de tioéter o éter, respectivamente.

15 En una realización ejemplar, R⁵ incluye el grupo de modificación polimérico. En otra realización ejemplar, R⁵ incluye tanto el grupo de modificación polimérico como un enlazador, L, uniendo el grupo de modificación al resto de la molécula. Como se ha analizado anteriormente, L puede ser una estructura lineal o ramificada. De forma análoga, el grupo de modificación polimérico puede ser ramificado o lineal.

Polímeros solubles en agua

20 Se conocen muchos polímeros solubles en agua por los expertos en la técnica y son útiles en la práctica de la presente invención. La expresión polímero soluble en agua incluye especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrano, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poli (aminoácidos), por ejemplo, poli(ácido aspártico) y poli(ácido glutámico); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éteres), por ejemplo, poli(etilenglicol); péptidos, proteínas, y similares. La presente invención puede practicarse con cualquier polímero soluble en agua con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el que el resto del conjugado puede estar unido.

30 También pueden encontrarse procedimientos para la activación de polímeros en el documento WO 94/17039, la Pat. de Estados Unidos n.º 5.324.844, el documento WO 94/18247, el documento WO 94/04193, la Pat. de Estados Unidos n.º 5.219.564, la Pat. de Estados Unidos n.º 5.122.614, el documento WO 90/13540, la Pat. de Estados Unidos n.º 5.281.698, y además el documento WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros activados y péptidos, por ejemplo Factor de Coagulación VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (Pat. de Estados Unidos n.º 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y col., App. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)).

35 Los polímeros solubles en agua preferidos son aquellos en los que una parte sustancial de las moléculas de polímero de la muestra de polímero es de aproximadamente el mismo peso molecular; dichos polímeros son "homodispersos".

40 La presente invención se ilustra adicionalmente por referencia a un conjugado de poli(etilenglicol). 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); y Bhadra, y col., Pharmazie, 57:5-29 (2002). Se conocen en la técnica rutas para preparar moléculas PEG reactivas y formar conjugados usando las moléculas reactivas. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.672.662 describe un conjugado soluble en agua y aislable de un éster activo de un ácido polimérico seleccionado de poli(óxidos de alquileo), poli(polioles oxietilados), poli(alcoholes olefínicos), y poli(acrilomorfolina) lineales o ramificados.

45 La Patente de Estados Unidos n.º 6.376.604 expone un procedimiento para preparar un 1-benzotriazolilcarbonato éster soluble en agua de un polímero soluble en agua y no peptídico haciendo reaccionar un hidroxilo terminal del polímero con di(1-benzotriazolil)carbonato en un disolvente orgánico. El éster activo se usa para formar conjugados con un agente biológicamente activo, tal como una proteína o péptido.

50 El documento WO 99/45964 describe un conjugado que comprende un agente biológicamente activo y un polímero soluble en agua activado que comprende una estructura polimérica que tiene al menos un extremo unido a la estructura polimérica a través de una unión estable, en donde al menos un extremo comprende un residuo ramificado que tiene grupos reactivos proximales unidos al resto de ramificación, en el que el agente biológicamente activo está unido a al menos uno de los grupos reactivos proximales. Otros poli(etilenglicoles) ramificados se describen en el documento WO 96/21469. La Patente de Estados Unidos n.º 5.932.462 describe un conjugado formado con una molécula de PEG ramificada que incluye un extremo ramificado que incluye grupos funcionales reactivos. Los grupos reactivos libres están disponibles para reaccionar con una especie biológicamente activa, tal como una proteína o péptido, formando conjugados entre el poli(etilenglicol) y la especie biológicamente activa. La

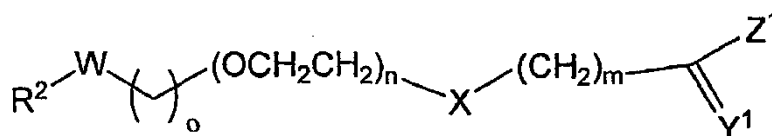
Patente de Estados Unidos n.º 5.446.090 describe un enlazador PEG bifuncional y su uso en la formación de conjugados que tienen un péptido en cada uno de los extremos del enlazador PEG.

Los conjugados que incluyen uniones PEG degradables se describen en el documento WO 99/34833; y el documento WO 99/14259, así como en la Patente de Estados Unidos n.º 6.348.558. Dichas uniones degradables son aplicables en la presente invención.

Los procedimientos reconocidos en la técnica de la activación polimérica que se han expuesto anteriormente son para su uso en el contexto de la presente invención en la formación de polímeros ramificados expuestos en la presente memoria y también para la conjugación de estos polímeros ramificados con otras especies, por ejemplo, azúcares, nucleótidos de azúcares y similares.

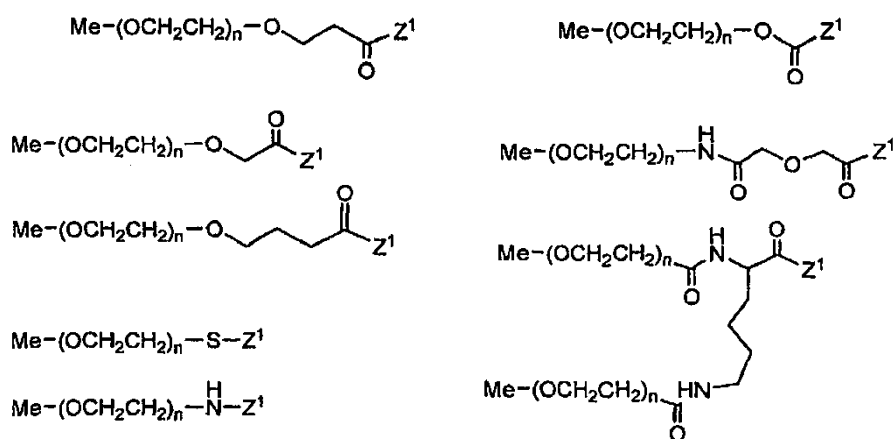
Un polímero soluble en agua ejemplar es poli(etilenglicol), por ejemplo, metoxi-poli(etilenglicol). El poli(etilenglicol) usado en la presente invención no se limita a cualquier forma particular o rango de peso molecular. Para las moléculas de poli(etilenglicol) ramificadas, el peso molecular es preferiblemente entre 500 y 100.000. Se usa preferiblemente un peso molecular de 2000-60.000 y preferiblemente de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 40.000.

En una realización ejemplar, las moléculas de poli(etilenglicol) de la invención incluyen, pero no se limitan a, las especies expuestas a continuación.



en la que R² es H, alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, por ejemplo, acetal, OHC-, H₂N-CH₂CH₂-, HS-CH₂CH₂- y -(CH₂)_qC(Y¹)Z²; -nucleótido de azúcar o proteína. El índice "n" representa un número entero de 1 a 2500. Los índices m, o y q representan independientemente números enteros de 0 a 20. El símbolo Z representa OH, NH₂, halógeno, S-R³, la porción de alcohol de ésteres activados, -(CH₂)_pC(Y²)V, -(CH₂)_pU(CH₂)_sC(Y²)_v, nucleótido de azúcar, proteína y grupos salientes, por ejemplo, imidazol, p-nitrofenilo, HOBT, tetrazol, haluro. Los símbolos X, Y¹, Y², W, U representan independientemente los residuos O, S, N-R⁴. El símbolo V representa OH, NH₂, halógeno, S-R⁵, el componente alcohol de ésteres activados, el componente amina de amidas activadas, nucleótidos de azúcar y proteínas. Los índices p, s y v son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 0 a 20. Los símbolos R³, R⁴ y R⁵ representan independientemente H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

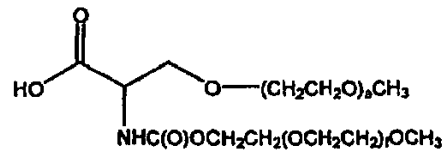
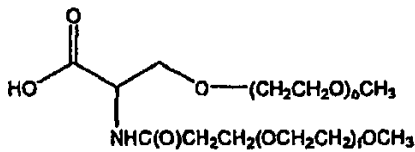
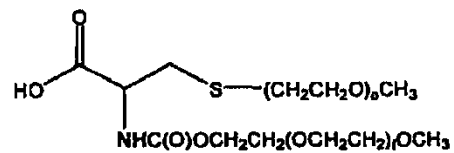
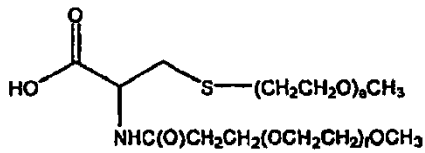
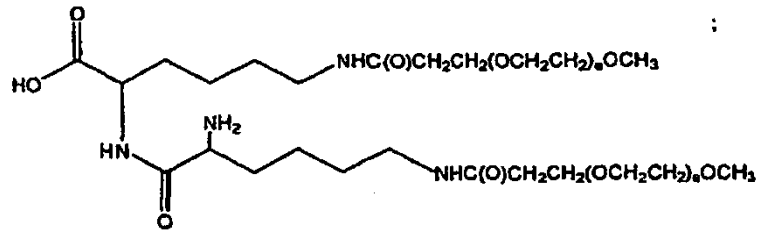
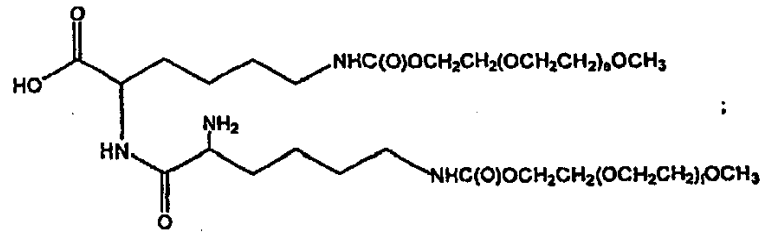
En otras realizaciones ejemplares, la molécula de poli(etilenglicol) se selecciona entre las siguientes:



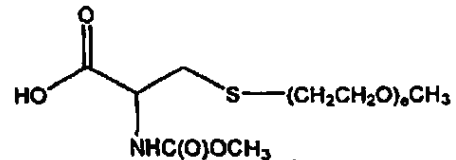
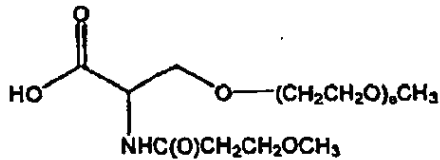
En otra realización, el poli(etilenglicol) es un PEG ramificado que tiene más de un residuo PEG unido. Los ejemplos de PEG ramificados se describen en la Pat. de Estados Unidos n.º 5.932.462; la Pat. de Estados Unidos n.º 5.342.940; la Pat. de Estados Unidos n.º 5.643.575; la Pat. de Estados Unidos n.º 5.919.455; la Pat. de Estados Unidos n.º 6.113.906; la Pat. de Estados Unidos n.º 5.183.660; el documento WO 02/09766; Kodera Y., Bioconjugate Chemistry 5: 283-288 (1994); e Yamasaki y col., Agric. Biol. Chem., 52: 2125-2127, 1998. En una realización preferida, el peso molecular de cada poli(etilenglicol) del PEG ramificado es menor de o igual a 40.000 daltons.

Los residuos de modificación poliméricos representativos incluyen estructuras que se basan en aminoácidos que contienen cadena lateral, por ejemplo, serina, cisteína, lisina y péptidos pequeños, por ejemplo, lys-lys. Las

estructuras ejemplares incluyen:



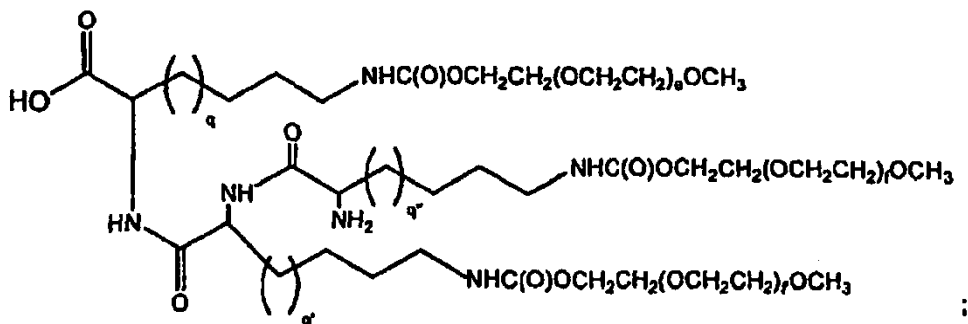
5



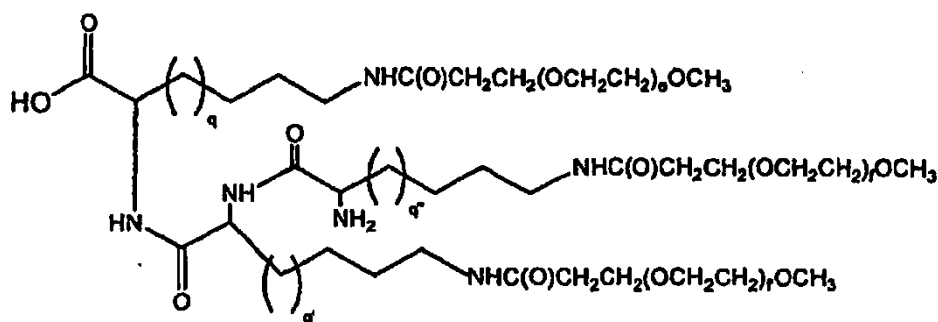
; y

Los expertos apreciarán que la amina libre en las estructuras de di-lisina puede también estar pegilada a través de un enlace amida o uretano con un residuo PEG.

10 En otra realización más, el residuo de modificación polimérica es un residuo PEG ramificado que se basa en un péptido de tri-lisina. La tri-lisina puede estar mono-, di-, tri-, o tetra-PEG-ilada. Las especies ejemplares de acuerdo con esta realización tienen las fórmulas:

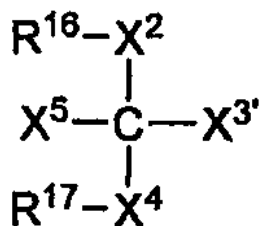


y



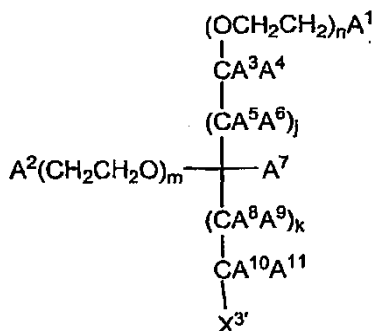
en las que los índices e, f y f son números enteros independientemente seleccionados de 1 a 2500; y los índices q, q' y q'' son números enteros independientemente seleccionados de 1 a 20.

- 5 Como será evidente para los expertos, los polímeros ramificados de uso en la invención incluyen variaciones en los temas que se han expuesto anteriormente. Por ejemplo, el conjugado de di-lisina-PEG que se ha mostrado anteriormente puede incluir tres subunidades poliméricas, la tercera unida a la α -amina mostrada como no modificada en la estructura anterior. De forma análoga, el uso de una tri-lisina funcionalizada con tres o cuatro subunidades poliméricas marcadas con el residuo de modificación polimérica de manera deseada está dentro del alcance de la invención.
- 10 Como se analiza en la presente memoria, el PEG de uso en los conjugados de la invención puede ser lineal o ramificado. Un precursor ejemplar de uso para formar los conjugados peptídicos que contienen PEG ramificado de acuerdo con esta realización de la invención tiene la fórmula:



(III).

- 15 Otro precursor ejemplar de uso para formar los conjugados peptídicos que contienen PEG ramificado de acuerdo con esta realización de la invención tiene la fórmula:



- 20 en la que los índices m y n son números enteros independientemente seleccionados de 0 a 5000, A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸, A⁹, A¹⁰ y A¹¹ son miembros independientemente seleccionados de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, -NA¹²A¹³, -OA¹² y -SiA¹²A¹³, A¹² y A¹³ son miembros independientemente seleccionados de alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

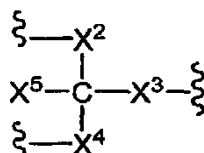
- 25 Las especies poliméricas ramificadas de acuerdo con esta fórmula son polímeros solubles en agua básicamente puros. X³ es un residuo que incluye un grupo funcional ionizable (por ejemplo, OH, COOH, H₂PO₄, HSO₃, NH₂, y sales de los mismos, etc.) u otro grupo funcional reactivo, por ejemplo, como se describe a continuación. C es carbono. X⁵, R¹⁶ y R¹⁷ se seleccionan independientemente de grupos no reactivos (por ejemplo, H, alquilo sin sustituir, heteroalquilo sin sustituir) y grupos poliméricos (por ejemplo, PEG). X² y X⁴ son fragmentos de enlace que básicamente son preferiblemente no reactivos en condiciones fisiológicas, que pueden ser iguales o diferentes. Un
- 30 enlazador ejemplar no incluye ni residuos aromáticos ni de éster. Como alternativa, estas uniones pueden incluir uno

o más residuos que están diseñados para degradarse en las condiciones fisiológicamente pertinentes, por ejemplo, ésteres, disulfuros, etc. X^2 y X^4 unen los grupos poliméricos R^{16} y R^{17} a C. Cuando X^3 se hace reaccionar con un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en un enlazador, azúcar o casete enlazador-azúcar, X^3 se convierte en un componente del fragmento de unión X^3 .

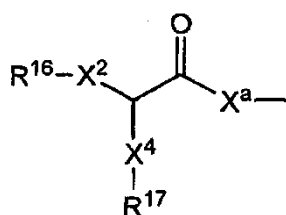
- 5 Los fragmentos de unión ejemplares para X^2 , X^3 y X^4 se seleccionan independientemente e incluyen S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH y NHC(O)O, y OC(O)NH, CH₂S, CH₂O, CH₂CH₂O, CH₂CH₂S, (CH₂)_oO, (CH₂)_oS o (CH₂)_oY'-PEG en donde, Y' es S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH, o O y o es un número entero de 1 a 50. En una realización ejemplar, los fragmentos de unión X^2 y X^4 son fragmentos de unión diferentes.

- 10 En una realización ejemplar, el precursor (Fórmula III), o un derivado activado del mismo, se hace reaccionar con, y está unido de este modo a un azúcar, un azúcar activado o un nucleótido de azúcar a través de una reacción entre X^3 y un grupo de reactividad complementaria en el residuo azúcar, por ejemplo, una amina. Como alternativa, X^3 reacciona con un grupo funcional reactivo en un precursor con respecto al enlazador, L. Uno o más de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 o R^6 de las Fórmulas I y II pueden incluir el residuo de modificación polimérico ramificado, o este residuo unido a través de L.

- 15 En una realización ejemplar, el residuo:



- 20 es el grupo enlazador, L. En esta realización, un enlazador ejemplar se obtiene a partir de un aminoácido natural o sintético, un análogo aminoacídico o un mimético aminoacídico, o un pequeño péptido formado de una o más de dichas especies. Por ejemplo, ceritos polímeros ramificados encontrados en los compuestos de la invención tienen la fórmula:



(IV)

- 25 X^a es un fragmento de unión que está formado por la reacción de un grupo funcional reactivo, por ejemplo, X^3 , en un precursor del residuo de modificación polimérica ramificado y un grupo funcional reactivo en el residuo de azúcar, o un precursor a un enlazador. Por ejemplo, cuando X^3 es un ácido carboxílico, puede activarse y unirse directamente a un grupo amina colgante de un amino-sacárido (por ejemplo, Sia, GalNH₂, GlcNH₂, ManNH₂, etc.), formando un X^a , es decir, una amida. A continuación en la presente memoria se describen grupos funcionales reactivos ejemplares adicionales y precursores activados. El índice c representa un número entero de 1 a 10. Los otros símbolos tienen la misma identidad que los analizados anteriormente.

En otra realización ejemplar, X^a es un residuo de unión formado con otro enlazador:

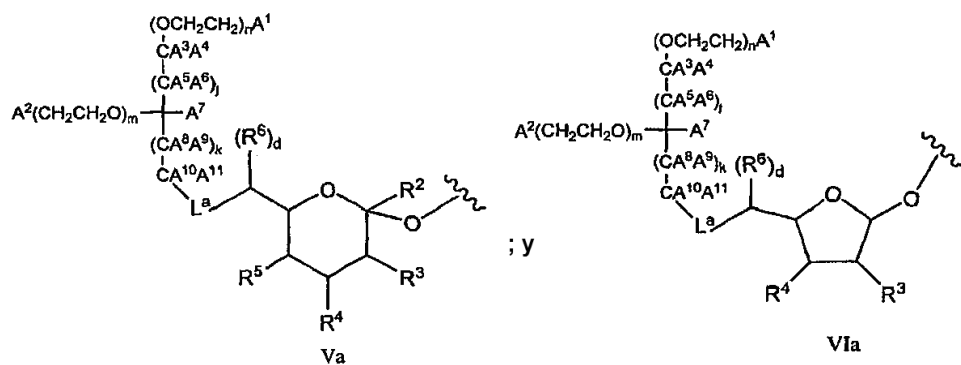
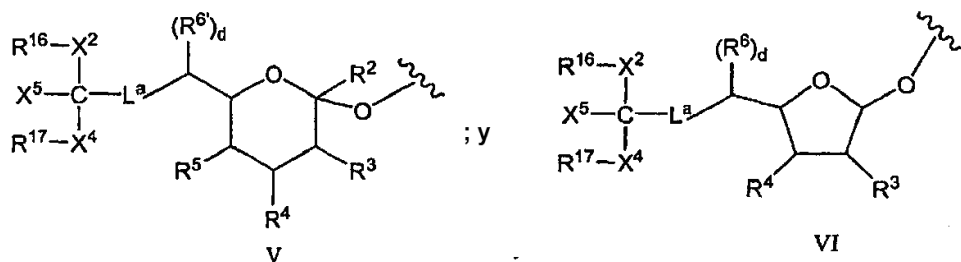


en la que X^b es un segundo fragmento de unión y se selecciona independientemente entre los grupos descritos para X^a , y, de forma similar a L, L^1 es un enlace, alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir.

Las especies ejemplares para X^a y X^b incluyen S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), C(O)NH y NHC(O)O y OC(O)NH.

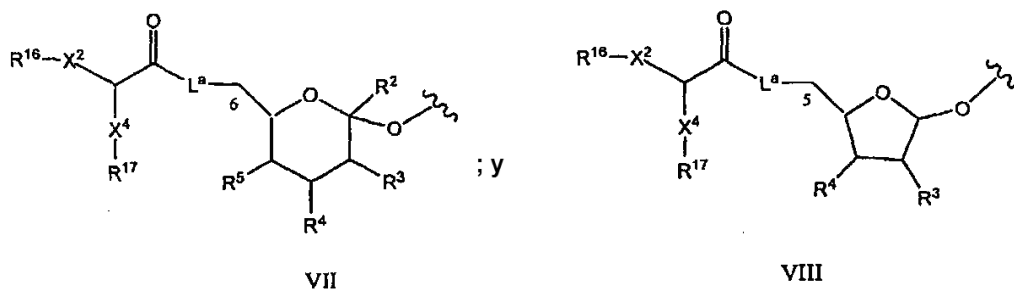
- 35 En otra realización ejemplar, X^4 es un enlace peptídico a R^{17} , que es un aminoácido, un di-péptido (por ejemplo, Lys-Lys) o tri-péptido (por ejemplo, Lys-Lys-Lys) en el que el residuo o residuos alfa-amino y/o el heteroátomo o heteroátomos de cadena lateral se modifican con un residuo de modificación polimérico.

En una realización ejemplar adicional, los conjugados peptídicos de la invención incluyen un residuo, por ejemplo, un residuo R^{15} que tiene una fórmula que se selecciona entre:



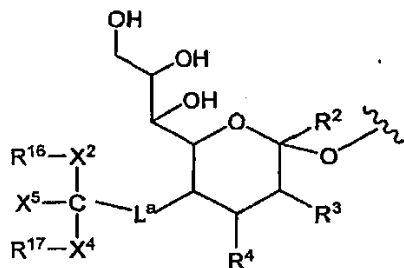
en las que la identidad de los radicales representados por los diversos símbolos es la misma que se ha analizado anteriormente en el presente documento. L^a es un enlace o un enlazador como se ha analizado anteriormente para L y L^1 , por ejemplo, residuo alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir. En una realización ejemplar L^a es un residuo de la cadena lateral de ácido siálico que se funcionaliza con el residuo de modificación polimérica como se muestra. Los residuos L^a ejemplares incluyen cadenas de alquilo sustituido o sin sustituir que incluyen uno o más OH o NH_2 .

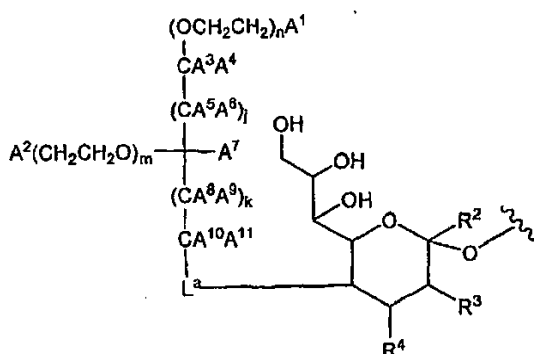
En otra realización ejemplar más, la invención proporciona conjugados peptídicos que tienen un residuo, por ejemplo, un residuo R^{15} con la fórmula:



La identidad de los radicales representados por los diversos símbolos es la misma que se ha analizado anteriormente en el presente documento. Como los expertos apreciarán, el grupo enlazador en las Fórmulas VII y VIII es igualmente aplicable a los demás azúcares modificados expuestos en la presente memoria. En una realización ejemplar, las especies de las Fórmulas VII y VIII son los residuos R^{15} unidos a las estructuras glicano expuestas en la presente memoria.

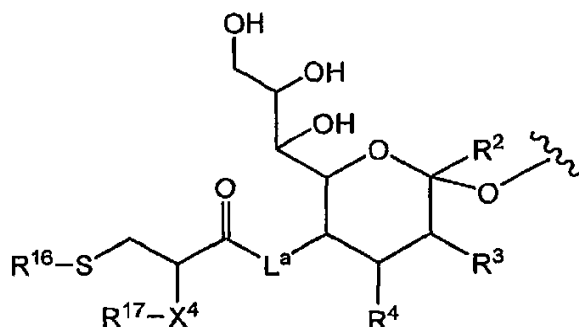
En otra realización ejemplar más, el conjugado peptídico de Factor VII o Factor VIIa incluye un residuo R^{15} con una fórmula que es un miembro seleccionado de:





5 en las que las identidades de los radicales son como se han analizado anteriormente. Una especie ejemplar para L^a es $-(CH_2)_hC(O)NH(CH_2)_jC(O)NH-$, en la que los índices h y j son números enteros independientemente seleccionados de 0 a 10. Una especie ejemplar adicional es $-C(O)NH-$. Los índices m y n son números enteros independientemente seleccionados de 0 a 5000. $A^1, A^2, A^3, A^4, A^5, A^6, A^7, A^8, A^9, A^{10}$ y A^{11} son miembros independientemente seleccionados de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, $-NA^{12}A^{13}$, $-OA^{12}$ y $-SiA^{12}A^{13}$. A^{12} y A^{13} son miembros independientemente seleccionados de alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

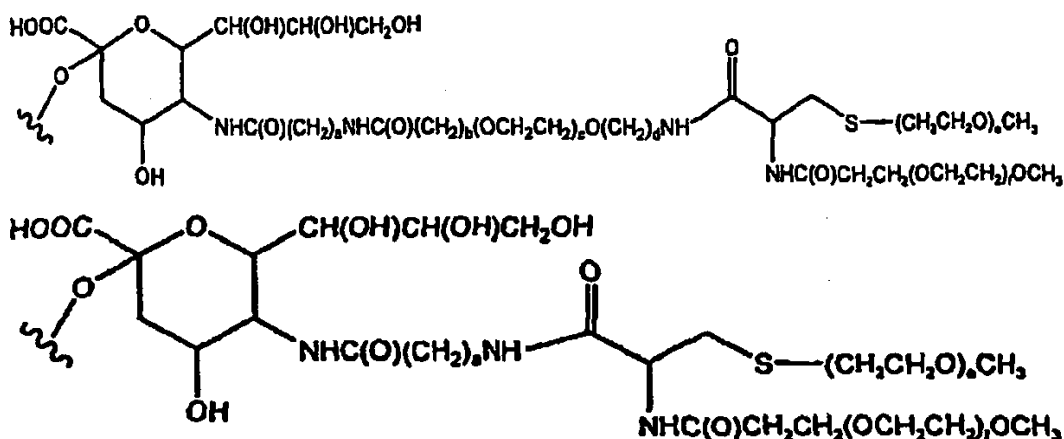
10 En una realización ejemplar, el grupo de unión a glucosilo tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:

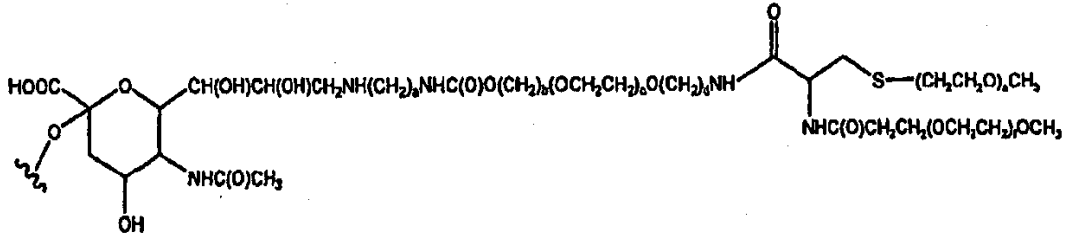
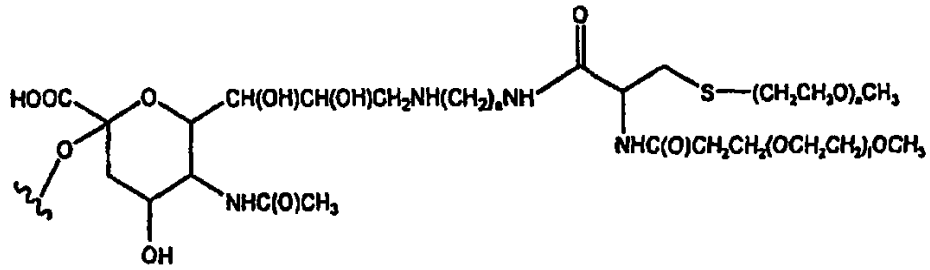


15 Las realizaciones de la invención que se han expuesto anteriormente se ilustran adicionalmente por referencia a especies en las que el polímero es un polímero soluble en agua, particularmente poli(etilenglicol) ("PEG"), por ejemplo, metoxi-poli(etilenglicol). Los expertos en la técnica apreciarán que el enfoque en las secciones que se indican a continuación es con fines de claridad de ilustración y los diversos motivos descritos usando PEG como un polímero ejemplar son aplicables igualmente a especies en las que se utiliza un polímero distinto de PEG.

20 PEG de cualquier peso molecular, por ejemplo, 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa y 45 kDa es útil en la presente invención.

En una realización ejemplar, el residuo R^{15} tiene una fórmula que es un miembro seleccionado del grupo:

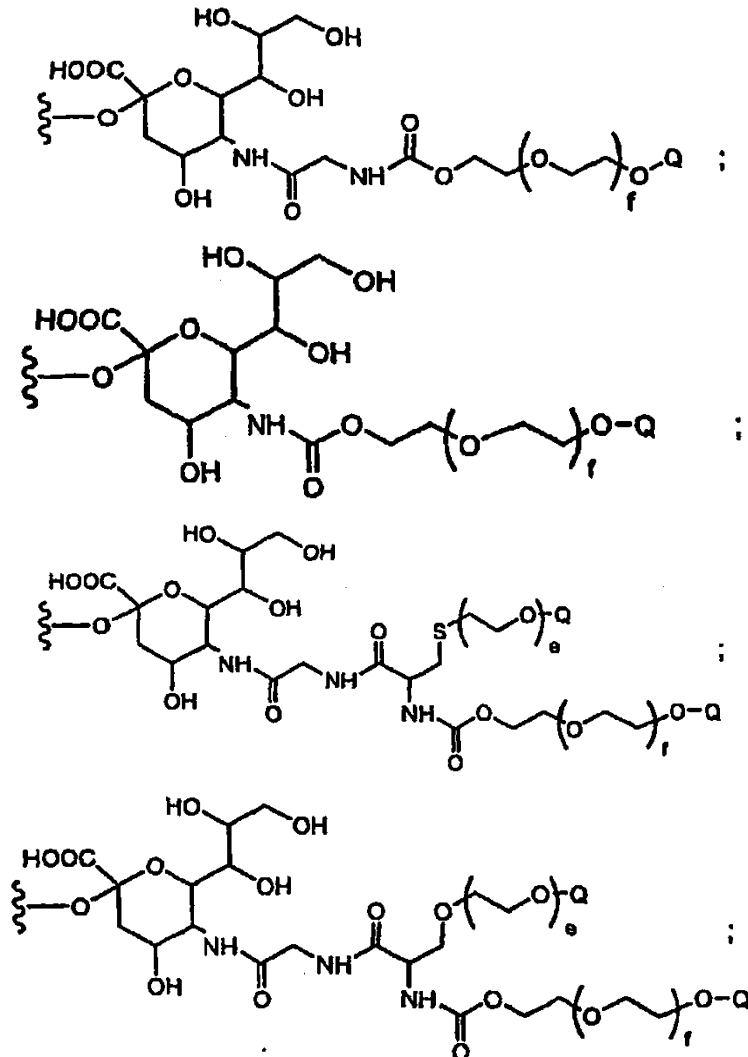


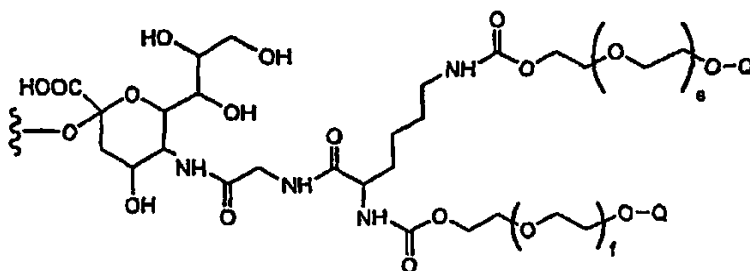


y

En cada una de las estructuras anteriores, el fragmento enlazador $-(\text{CH}_2)_a-$ puede estar presente o ausente.

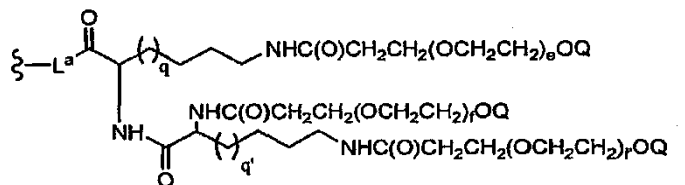
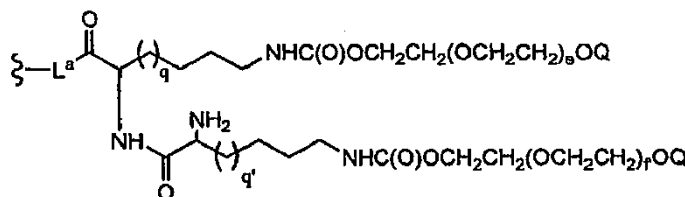
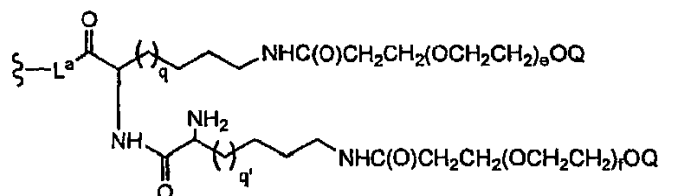
- 5 En otras realizaciones ejemplares, el conjugado peptídico incluye un residuo R^{15} seleccionado del grupo:



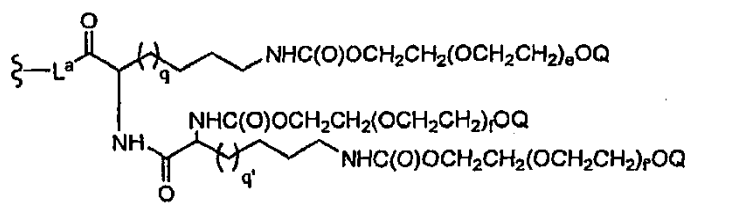


5 En cada una de las fórmulas anteriores, los índices e y f se seleccionan independientemente de los números enteros de 1 a 2500. En realizaciones ejemplares adicionales, e y f se seleccionan para proporcionar un residuo PEG que es de aproximadamente 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa y 45 kDa. El símbolo Q representa alquilo sustituido o sin sustituir (por ejemplo, alquilo C₁-C₆, por ejemplo, metilo), heteroalquilo sustituido o sin sustituir o H.

Otros polímeros ramificados tienen estructuras basadas en péptidos de di-lisina (Lys-Lys), por ejemplo:

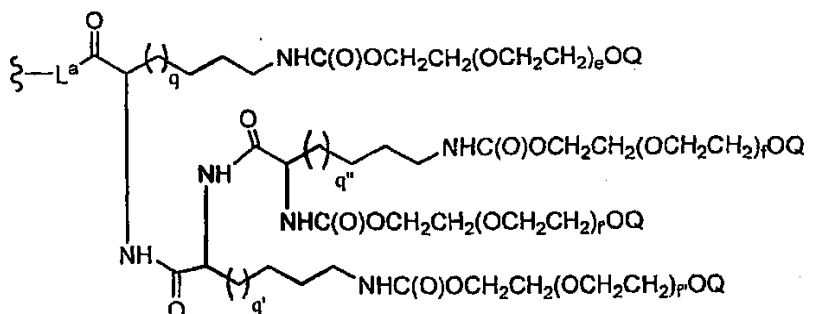


10

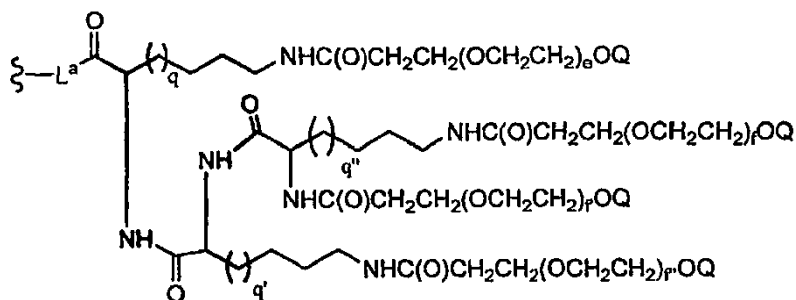


y

y péptidos de tri-lisina (Lys-Lys-Lys), por ejemplo:

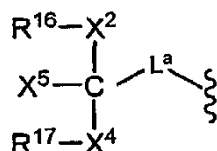


y

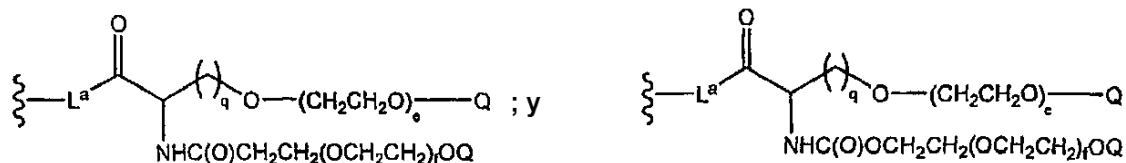
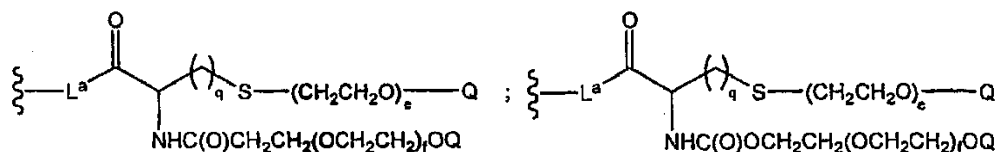


5 En cada una de las figuras anteriores, los índices e, f, f' y f'' representan números enteros independientemente seleccionados de 1 a 2500. Los índices q, q' y q'' representan números enteros independientemente seleccionados de 1 a 20.

En otra realización ejemplar, el grupo de modificación:

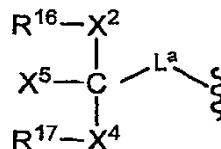


tiene una fórmula que es un miembro seleccionado de:

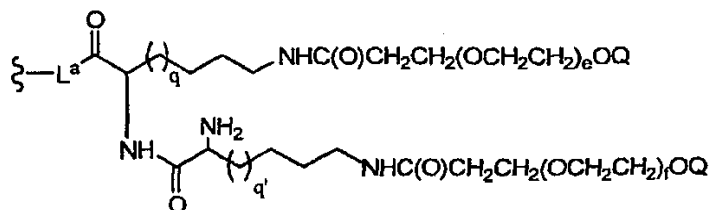


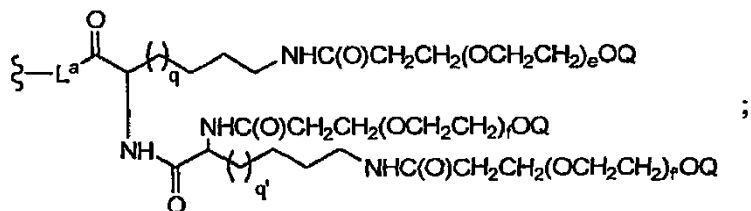
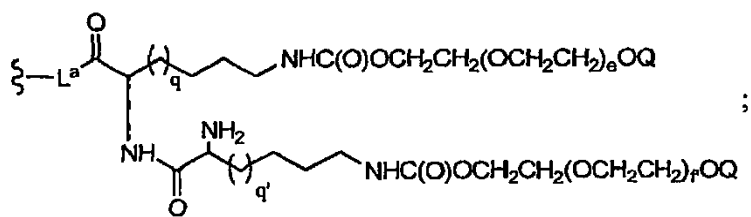
10 en donde Q es un miembro seleccionado de H y alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir. Los índices e y f son números enteros independientemente seleccionados de 1 a 2500, y el índice q es un número entero seleccionado de 0 a 20.

En otra realización ejemplar, el grupo de modificación:

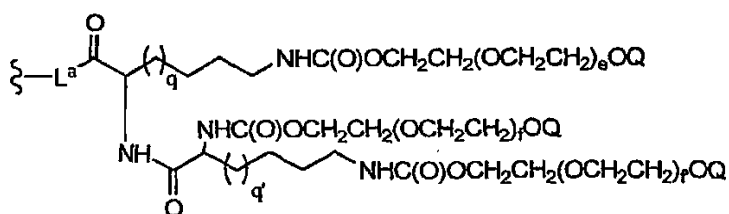


15 tiene una fórmula que es un miembro seleccionado entre:



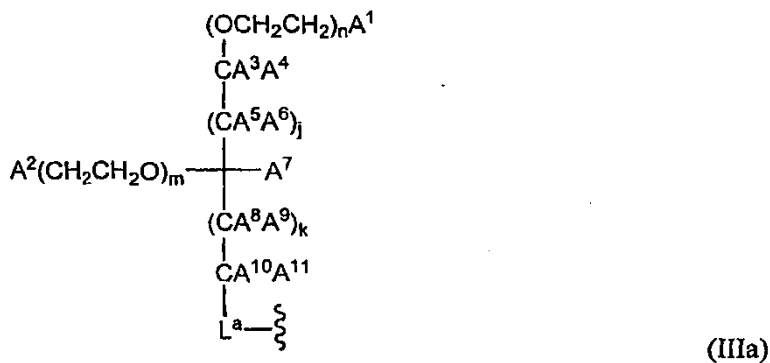


y



- 5 en donde Q es un miembro seleccionado de H y alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir. Los índices e, f y f' son números enteros independientemente seleccionados de 1 a 2500, y q y q' son números enteros independientemente seleccionados de 1 a 20.

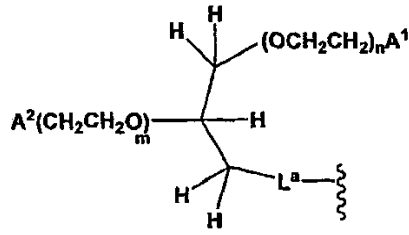
En otra realización ejemplar, el polímero ramificado tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



- 10 en la que los índices m y n son números enteros independientemente seleccionados de 0 a 5000. A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸, A⁹, A¹⁰ y A¹¹ son miembros independientemente seleccionados de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, -NA¹²A¹³, -OA¹² y -SiA¹²A¹³. A¹² y A¹³ son miembros independientemente seleccionados de alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

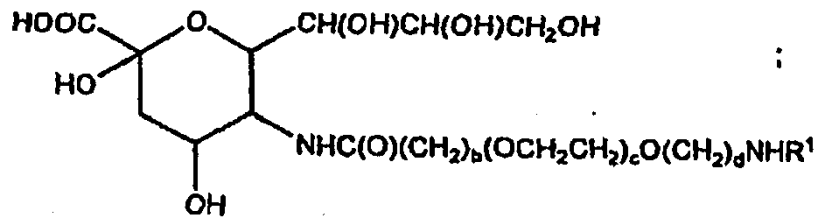
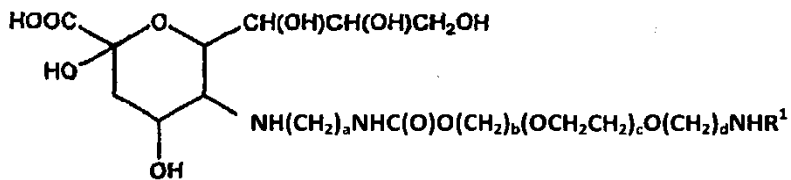
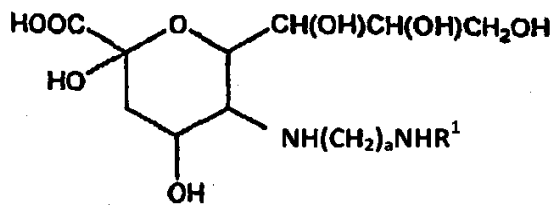
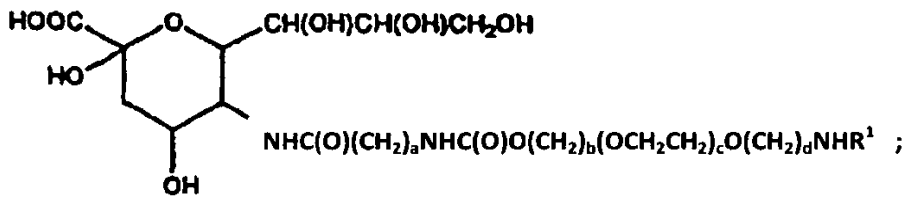
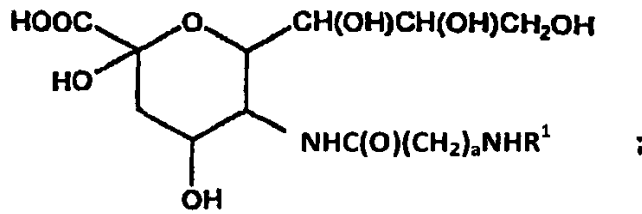
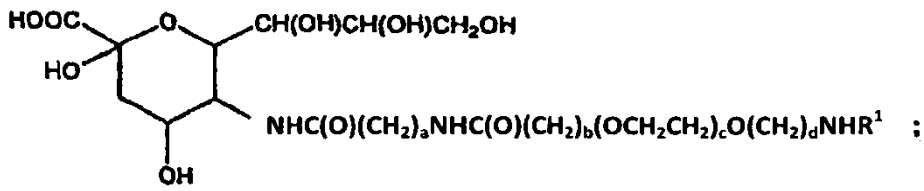
La fórmula IIIa es un subconjunto de Fórmula III. Las estructuras descritas por la Fórmula IIIa también se incluyen por la Fórmula III.

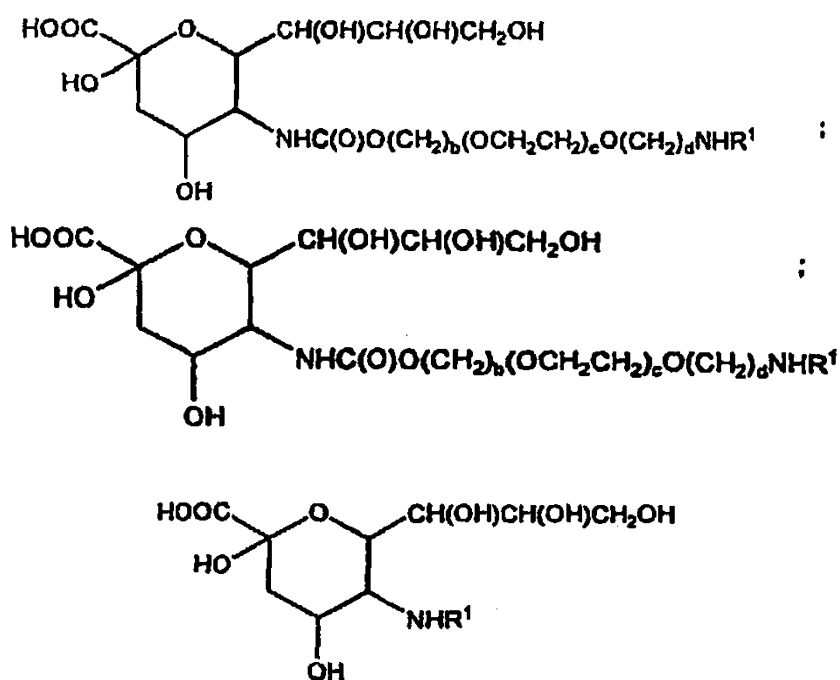
- 20 En otra realización ejemplar de acuerdo con la fórmula anterior, el polímero ramificado tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



En una realización ejemplar, cada uno de A¹ y A² es -OCH₃ o H.

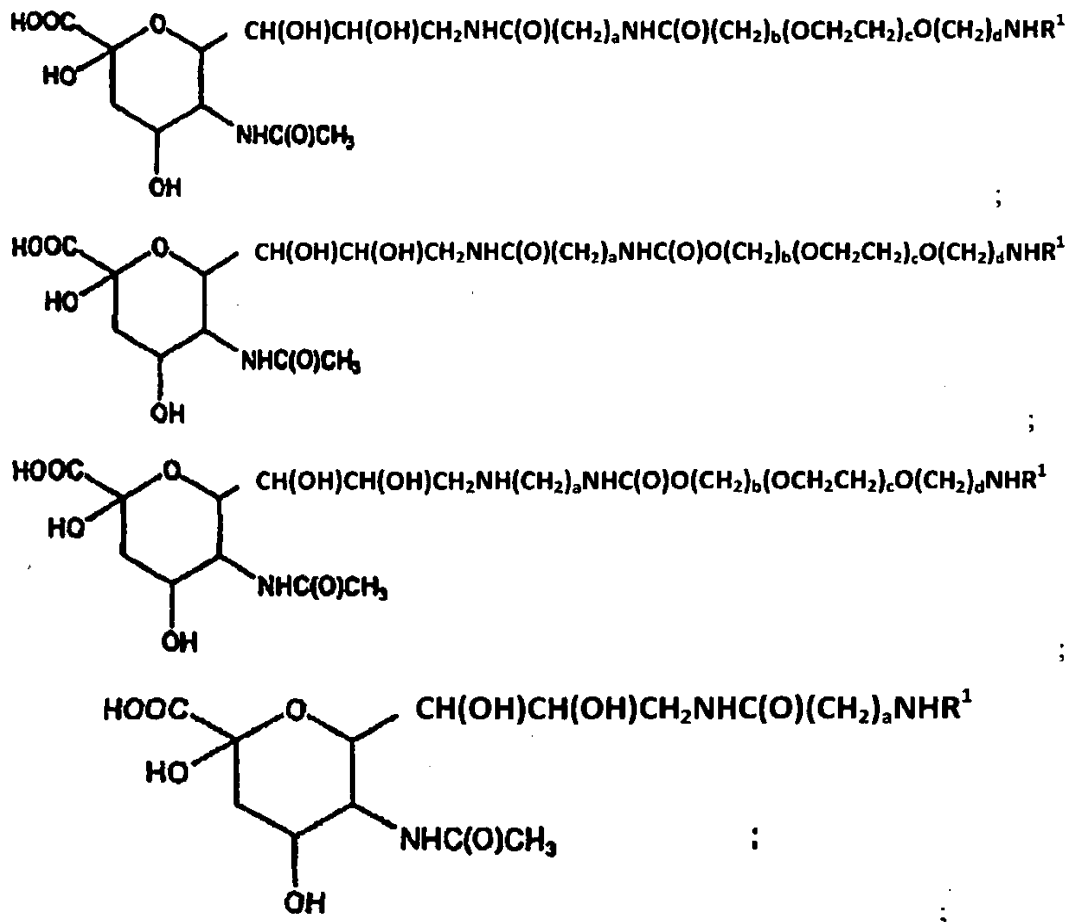
En una realización ilustrativa, el azúcar modificado es ácido siálico y los compuestos de azúcar modificado seleccionados para su uso en la invención tienen las fórmulas:



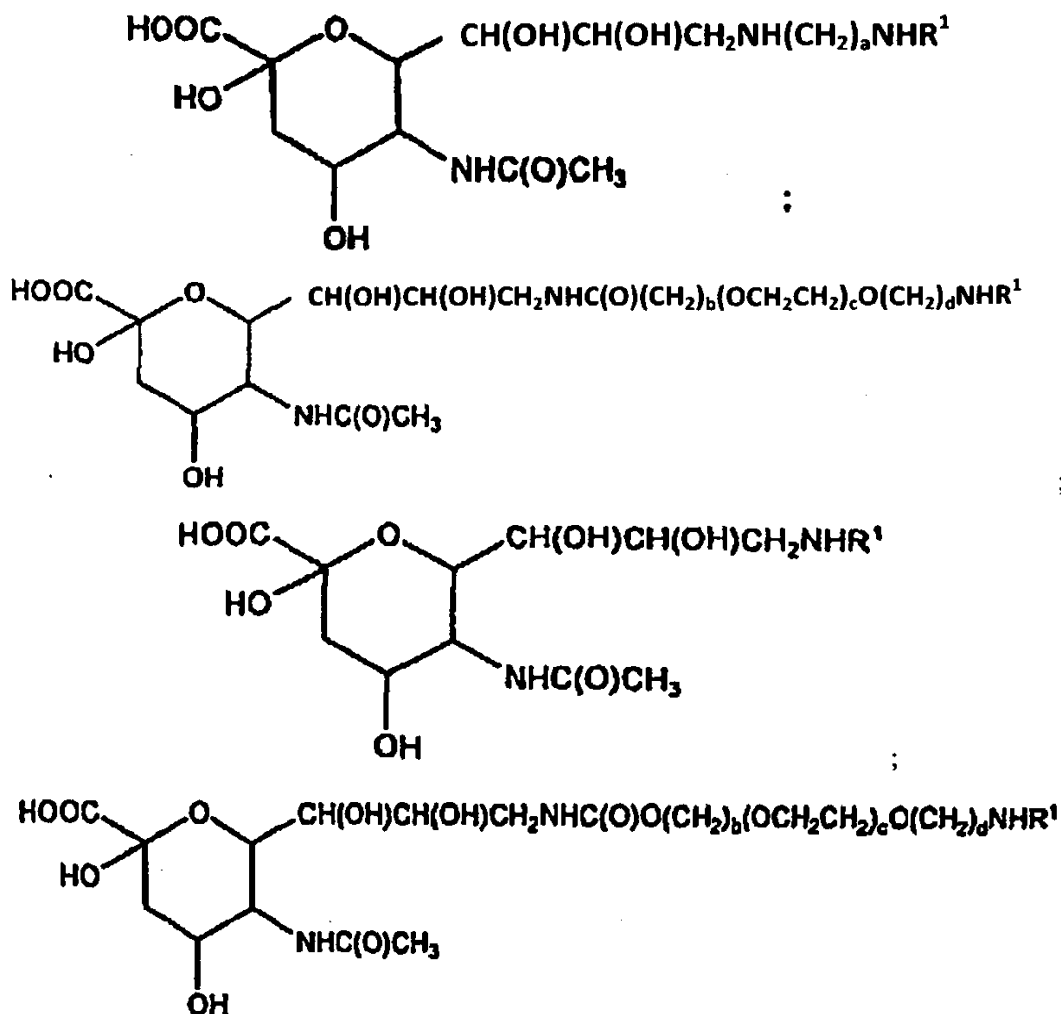


- 5 Los índices a, b y d son números enteros de 0 a 20. El índice c es un número entero de 1 a 2500. Las estructuras que se han expuesto anteriormente pueden ser componentes de R¹⁵.

En otra realización ilustrativa, un residuo hidroxilo primario del azúcar se funcionaliza con el grupo de modificación. Por ejemplo, el 9-hidroxilo de ácido siálico puede convertirse en la amina correspondiente y funcionalizarse para proporcionar un compuesto de acuerdo con la invención. Las fórmulas de acuerdo con esta realización incluyen:



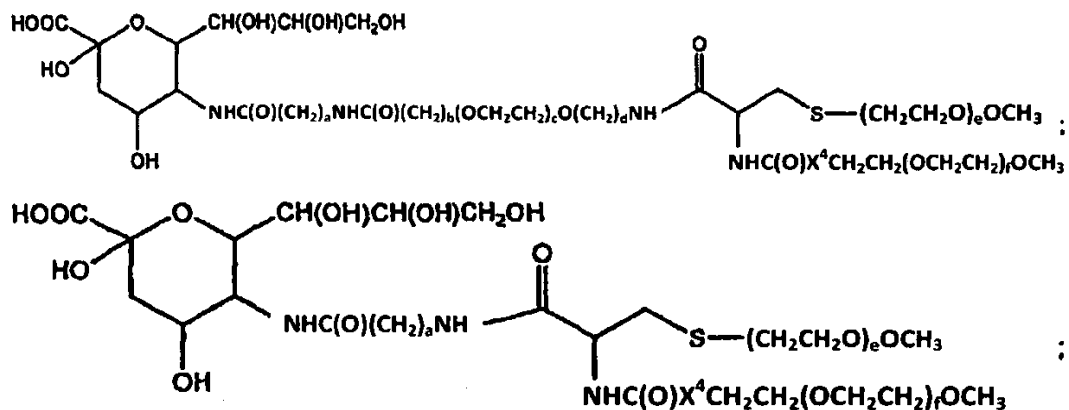
10

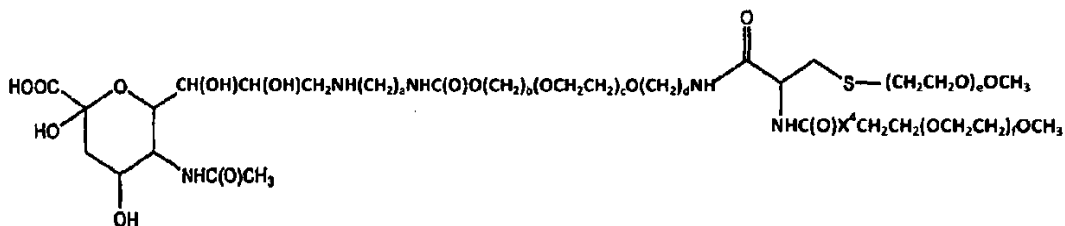
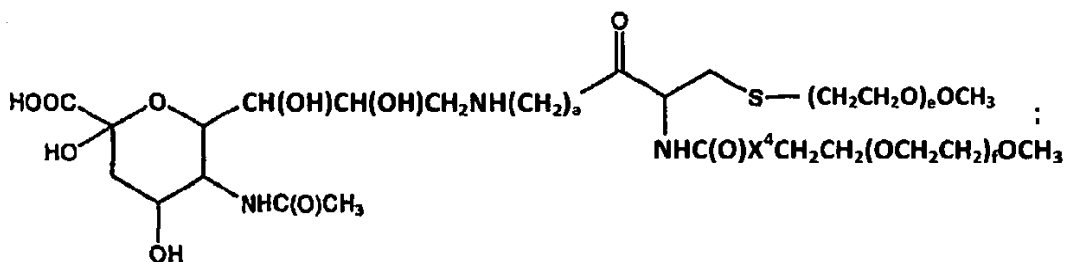


5 Las estructuras que se han expuesto anteriormente pueden ser componentes de R¹⁵.

Aunque la presente invención se ilustra en las secciones anteriores por referencia a PEG, como los expertos apreciarán, un conjunto de residuos de modificación poliméricos es útil en los compuestos y procedimientos expuestos en la presente memoria.

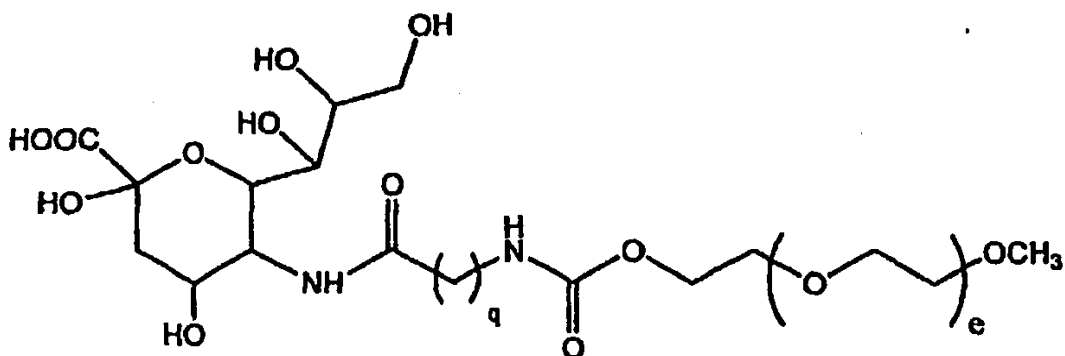
10 En las realizaciones seleccionadas, R¹ o L-R¹ es un PEG5 ramificado, por ejemplo, una de las especies que se han expuesto anteriormente. En una realización ejemplar, la estructura PEG ramificada se basa en un péptido de cisteína. Los azúcares modificados ilustrativos de acuerdo con esta realización incluyen:





5 en las que X^4 es un enlace o O. En cada una de las estructuras anteriores, el enlazador alquilamina $-(CH_2)_aNH$ puede estar presente o ausente. Las estructuras que se han expuesto anteriormente pueden ser componentes de $R^{15}/R^{15'}$.

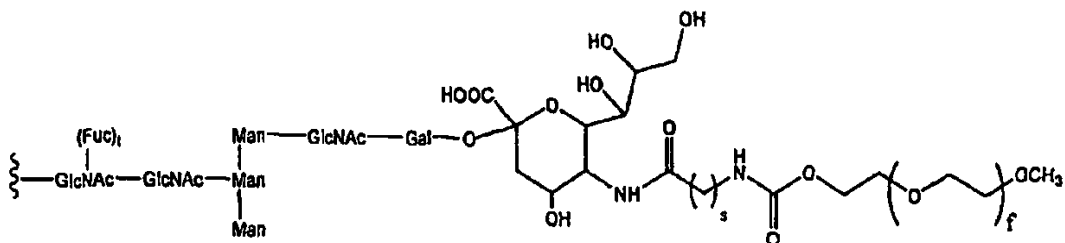
Como se analiza en la presente memoria, los ácidos siálicos modificados con polímero de uso en la invención también pueden ser estructuras lineales. Por lo tanto, la invención proporciona conjugados que incluyen un residuo de ácido siálico obtenido a partir de una estructura tal como:



10 en la que los índices q y e son como se han analizado anteriormente.

Los azúcares modificados ejemplares se modifican con polímeros solubles en agua o polímeros insolubles en agua. Los ejemplos de polímero útil se ilustran adicionalmente a continuación.

15 En otra realización ejemplar, el péptido se obtiene a partir de células de insecto, remodeladas añadiendo GlcNAc y Gal al núcleo de manosa y glucopegiladas usando un ácido siálico que lleva un residuo PEG lineal, proporcionando un péptido de Factor VII o el Factor VIIa que comprende al menos un residuo que tiene la fórmula:



en la que el índice t es un número entero de 0 a 1; el índice s representa un número entero de 1 a 10; y el índice f representa un número entero de 1 a 2500.

Polímeros insolubles en agua

20 En otra realización, análogos a los que se han analizado anteriormente, los azúcares modificados incluyen un polímero insoluble en agua, en lugar de un polímero soluble en agua. Los conjugados de la invención también

pueden incluir uno o más polímeros insolubles en agua. Esta realización de la invención se ilustra por el uso del conjugado como un vehículo con el que administrar un péptido terapéutico de manera controlada. Se conocen sistemas de administración de fármacos poliméricos en la técnica. Véase, por ejemplo, Dunn y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Los expertos en la técnica apreciarán que sustancialmente cualquier sistema de administración de fármacos conocido es aplicable a los conjugados de la presente invención.

Los motivos expuestos anteriormente para R¹, L-R¹, R¹⁵, R^{15'} y otros radicales son aplicables igualmente a polímeros insolubles en agua, que pueden incorporarse en las estructuras lineales y ramificadas sin limitación utilizando química fácilmente accesible para los expertos en la técnica. De forma análoga, la incorporación de estas especies en cualquiera de los azúcares modificados analizados en la presente memoria está dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, la invención proporciona conjugados que contienen, y para su uso en la preparación de dichos conjugados, ácido siálico y otros residuos de azúcar modificados con un polímero insoluble en agua lineal o ramificado, y análogos activados de las especies de ácido siálico modificadas (por ejemplo, CMP-Sia- (polímero insoluble en agua)).

Los polímeros insolubles en agua representativos incluyen, pero no se limitan a, polifosfazinas, poli(alcoholes vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poli(acrilamidas), polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, haluros de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos, poli(metacrilato de metilol), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo) polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli (etilentereftalato), poli(acetato de vinilo), cloruro de polivinilo, poliestireno, polivinilpirrolidona, pluronics y polivinilfenol y copolímeros de los mismos.

Polímeros naturales modificados sintéticamente de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa y nitrocelulosas. Los miembros particularmente preferidos de las clases amplias de polímeros naturales modificados sintéticamente incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboximetilcelulosa, triacetato de celulosa, sal de sodio de sulfato de celulosa y polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos y ácido alginico.

Estos y los otros polímeros analizados en la presente memoria se pueden obtener fácilmente a partir de fuentes comerciales tales como Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.), Polysciences (Warrenton, PA.), Aldrich (Milwaukee, WI.), Fluka (Ronkonkoma, NY), y BioRad (Richmond, CA), o sintetizarse a partir de monómeros obtenidos de estos proveedores usando técnicas convencionales.

Los polímeros biodegradables representativos de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, poliáctidas, poliglicólidos y copolímeros de los mismos, poli (etilentereftalato), poli(ácido butírico), ácido poli (ácido valérico), poli (lactida-cocaprolactona), poli(lactida-co-glicólido), polianhídridos, poliortoésteres, mezclas y copolímeros de los mismos. De particular uso son las composiciones que forman geles, tales como las que incluyen colágeno, pluronics y similares.

Los polímeros de uso en la invención incluyen polímeros "híbridos" que incluyen materiales insolubles en agua que tienen dentro de al menos una porción de su estructura una molécula biorreabsorbible. Un ejemplo de dicho polímero es uno que incluye un copolímero insoluble en agua, que tiene una región biorreabsorbible, una región hidrófila y una pluralidad de grupos funcionales reticulables por cadena polimérica.

Para los fines de la presente invención, "materiales insolubles en agua" incluye materiales que son sustancialmente insolubles en agua o entornos que contienen agua. Por tanto, aunque ciertas regiones o segmentos del copolímero pueden ser hidrófilas o incluso hidrosolubles, la molécula polimérica, en su conjunto, no se disuelve en agua en ningún grado sustancial.

Para los fines de la presente invención, la expresión "molécula biorreabsorbible" incluye una región que es capaz de metabolizarse o degradarse y reabsorberse y/o eliminarse por vías de excreción normales del cuerpo. Dichos metabolitos o productos de degradación son, preferentemente, sustancialmente no tóxicos para el cuerpo.

La región biorreabsorbible puede ser hidrófoba o hidrófila, siempre que la composición copolimérica en su conjunto no se haga hidrosoluble. Por tanto, la región biorreabsorbible se selecciona en base a la preferencia de que el polímero, en su conjunto, permanezca insoluble en agua. En consecuencia, las propiedades relativas, es decir los tipos de grupos funcionales contenidos y las proporciones relativas de la región biorreabsorbible y la región hidrófila se seleccionan para garantizar que las composiciones biorreabsorbibles útiles sigan siendo insolubles en agua.

Los polímeros reabsorbibles ejemplares incluyen, por ejemplo, copolímeros de bloque reabsorbibles producidos de forma sintética de poli(ácido α -hidroxi-carboxílico)/poli(oxialquileno, (véase, Cohn y col., Patente de Estados Unidos n.º 4.826.945). Estos copolímeros no están reticulados y son hidrosolubles, de modo que el cuerpo puede excretar

las composiciones de copolímeros de bloque degradadas. Véase, Younes y col., J Biomed. Mater. Res. 21: 1301-1316 (1987); y Cohn y col., J Biomed. Mater. Res. 22: 993-1009 (1988).

5 Los polímeros bioreabsorbibles preferidos en la presente memoria incluyen uno o más componentes seleccionados de poli(ésteres), poli(hidroxi ácidos), poli(lactonas), poli(amidas), poli(éster-amidas), poli (aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(fosfazinas), poli(fosfoésteres), poli(tioésteres), polisacáridos y mezclas de los mismos. Aún más preferiblemente, el polímero biorreabsorbible incluye un componente un componente de ácido poli(hidroxi). De los ácidos poli(hidroxi), se prefieren ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido policaproico, ácido polibutírico, ácido polivalérico y copolímeros y mezclas de los mismos.

10 Además de formar fragmentos que se absorben *in vivo* ("biorreabsorbidos"), los recubrimientos poliméricos preferidos para su uso en los procedimientos de la invención también pueden formar un fragmento excretable y/o metabolizable.

15 También se habla de copolímeros de orden superior. Por ejemplo, Casey y col., patente de Estados Unidos n.º 4.438.253, concedida el 20 de marzo de 1984, describe copolímeros de tri-bloque producidos a partir de la transesterificación de poli (ácido glicólico) y un poli (alquilenglicol) terminado en hidroxilo. Dichas composiciones se divulgan para su uso como suturas monofilamento reabsorbibles. La flexibilidad de dichas composiciones se controla mediante la incorporación de un ortocarbonato aromático, tal como ortocarbonato de tetra-p-tolilo en la estructura del copolímero.

20 También pueden utilizarse otros polímeros basados en ácido láctico y/o glicólico. Por ejemplo, Spinu, Patente de Estados Unidos n.º 5.202.413, que concedió el 13 de abril de 1993, describe copolímeros de multi-bloque biodegradables que tienen bloques ordenados secuencialmente de poliláctida y/o poliglicólido producidos mediante polimerización con apertura de anillo de lactida y/o glicólido sobre un diol oligomérico o un residuo de diamina, seguido de la extensión de la cadena con un compuesto difuncional, tal como un diisocianato, cloruro de diacilo o diclorosilano.

25 Las regiones biorreabsorbibles de los recubrimientos útiles en la presente invención se pueden denominar hidrolíticamente y/o enzimáticamente escindibles. Para los fines de la presente descripción, "hidrolíticamente escindible" hace referencia a la susceptibilidad del copolímero, especialmente de la regiones biorreabsorbibles, a la hidrólisis en agua o a un ambiente que contenga agua. De un modo similar, "enzimáticamente escindible" como se emplea en esta memoria, hace referencia a la tendencia del copolímero, especialmente de la región biorreabsorbible, a ser escindida por enzimas endógenas o exógenas.

30 Cuando se introducen en el cuerpo, la región hidrófila se puede procesar en fragmentos excretables y/o metabolizables. Por tanto, la región hidrófila puede incluir, por ejemplo, poliéteres, óxidos de polialquileno, polioles, poli (vinilpirrolidona), poli (alcohol vinílico), poli (alquinoxazolin), polisacáridos, carbohidratos, péptidos, proteínas y copolímeros y mezclas de los mismos. Además, la región hidrófila puede ser también, por ejemplo, un poli (óxido de alquileno). Dichos poli (óxidos de alquileno) pueden incluir, por ejemplo, poli (óxido de etileno), poli (óxido de propileno) y mezclas y copolímeros de los mismos.

35 También son útiles en la presente invención polímeros que son componentes de hidrogeles. Los hidrogeles son materiales poliméricos que son capaces de absorber cantidades relativamente grandes de agua. Los ejemplos de compuestos formadores de hidrogeles incluyen, pero no se limitan a, ácidos poliacrílicos, carboximetilcelulosa sódica, poli (alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, gelatina, carragenano y otros polisacáridos, ácido hidroxietilmetacrílico (HEMA), así como derivados de los mismos y similares. Se pueden producir hidrogeles que son estables, biodegradables y biorreabsorbibles. Además, las composiciones de hidrogeles pueden incluir subunidades que exhiban una o más de estas propiedades.

40 Se conocen composiciones de hidrogeles biocompatibles cuya integridad se puede controlar mediante reticulación y actualmente se prefieren para su uso en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, Hubbell y col., patentes de Estados Unidos n.º 5.410.016, concedida el 25 de abril de 1995 y 5.529.914, concedida el 25 de junio de 1996, desvelan sistemas hidrosolubles que son copolímeros de bloque reticulados que tienen un segmento de bloque central hidrosoluble en medio de dos extensiones hidrolíticamente inestables. Dichos copolímeros se protegen en sus extremos adicionalmente con funcionalidades de acrilato fotopolimerizables. Cuando se reticulan, estos sistemas se convierten en hidrogeles. El bloque central hidrosoluble de dichos copolímeros puede incluir poli (etilenglicol), mientras que las extensiones hidrolíticamente inestables pueden ser un poli (α -hidroxiácido), tales como ácido poliglicólico o ácido poliláctico. Véase, Sawhney y col., Macromolecules 26: 581-587 (1993).

45 En otra realización preferida, el gel es un gel termorreversible. Actualmente se prefieren geles termorreversibles que incluyen componentes, tales como pluronics, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, polisacáridos, hidrogel de poliuretano, hidrogel de poliuretano-urea y combinaciones de los mismos

55 En otra realización ejemplar más, el conjugado de la invención incluye un componente de un liposoma. Los liposomas se pueden preparar se acuerdo con procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo como se describe en Eppstein y col., patente de Estados Unidos n.º 4.522, 811. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones en liposomas disolviendo lípido o lípidos (tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil

5 fosfatidil colina, aracadoil fosfatidil colina y colesterol) en un disolvente inorgánico que después se evapora, dejando tras de sí una película fina de lípido seco sobre la superficie del envase. Después, en el envase se introduce una solución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable. Después, el envase se agita a mano para liberar el material lipídico de los laterales del envase y para dispersar los agregados lipídicos, de modo que se forma la suspensión liposómica.

Las micropartículas citadas anteriormente y los procedimientos de preparación de las micropartículas se ofrecen a modo de ejemplo y no pretenden definir el alcance de las micropartículas de uso en la presente invención. Será evidente para los expertos en la técnica que con junto de micropartículas, fabricadas por diferentes procedimientos, es útil en la presente invención.

10 Los formatos estructurales que se han analizado en el contexto de los polímeros hidrosolubles, tanto de cadena lineal como ramificada, son aplicables, generalmente, también con respecto a los polímeros insolubles en agua. Por tanto, por ejemplo, los núcleos de ramificación de cisteína, serina, dilisina y trisilina se pueden funcionalizar con dos restos poliméricos insolubles en agua. Los procedimientos usados para producir estas especies son, generalmente, estrechamente análogos a los usados para producir los polímeros hidrosolubles.

15 Biomoléculas

En otra realización preferida, el azúcar modificado es portador de una biomolécula. En realizaciones adicionales preferidas, la biomolécula es una proteína funcional, una enzima, un antígeno, un anticuerpo, un péptido, un ácido nucleico (p. ej., nucleótidos o nucleósidos sencillos, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos de una o más cadenas), lectinas, un receptor o una combinación de los mismos.

20 Las biomoléculas preferidas son esencialmente no fluorescentes, o emiten una cantidad tan mínima de fluorescencia que no son adecuadas en un ensayo para su uso como marcadores fluorescentes. Además, generalmente se prefiere el uso de biomoléculas que no sean azúcares. Una excepción a esta preferencia es el uso de un azúcar de otro modo de origen natural que está modificado por la unión covalente de otra entidad (por ejemplo, PEG, biomolécula, residuo terapéutico, residuo de diagnóstico, etc.). En una realización a modo de ejemplo, un residuo de
25 azúcar, que es una biomolécula, se conjugan con un brazo enlazador y el casete azúcar-brazo enlazador se conjuga después con un péptido a través de un procedimiento de la invención.

Las biomoléculas útiles en la práctica de la presente invención pueden proceder de cualquier fuente. Las biomoléculas pueden aislarse de fuentes naturales o pueden producirse mediante procedimientos sintéticos. Los péptidos pueden ser naturales o mutados. Las mutaciones pueden efectuarse mediante mutagénesis química, mutagénesis dirigida a sitio o mediante otros medios de inducción de mutaciones conocidos por los expertos en la
30 técnica. Los péptidos útiles en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, enzimas, antígenos, anticuerpos y receptores. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, intactos o fragmentos. Opcionalmente los péptidos son los productos de un programa de evolución dirigida.

Los péptidos y ácidos nucleicos tanto naturales como sintéticos son de utilidad en la presente invención; estas
35 moléculas pueden unirse a un componente de residuo de azúcar o a un agente de reticulación mediante cualquier grupo reactivo disponible. Por ejemplo, los péptidos pueden unirse a través de un grupo amina, carboxilo, sulfhidrilo o hidroxilo reactivo. El grupo reactivo puede residir en un extremo del péptido o en un sitio interno de la cadena peptídica. Los ácidos nucleicos pueden unirse a través de un grupo reactivo sobre una base (p. ej., amina exocíclica) o un grupo hidroxilo disponible sobre un residuo de azúcar (p. ej., 3'- o 5'-hidroxilo). Las cadenas peptídicas y de
40 ácidos nucleicos se pueden derivatizar además en uno o más sitios para permitir la unión de grupos reactivos adecuados a la cadena. Véase, Chrisey y *col.* Nucleic Acids Res. 24: 3031-3039 (1996).

En una realización preferida adicional, la biomolécula se selecciona para dirigir el péptido modificado mediante los procedimientos de la invención a un tejido específico, de modo que se potencia la liberación del péptido en ese tejido respecto a la cantidad de péptido no derivatizado que se libera en el tejido. En una realización más preferida
45 adicional, la cantidad de péptido derivatizado que se libera en un tejido específico en un periodo de tiempo seleccionado se potencia mediante la derivatización en al menos aproximadamente un 20 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 40 % y más preferiblemente al menos aproximadamente un 100 %. Actualmente, las biomoléculas preferidas para aplicaciones dirigidas incluyen anticuerpos, hormonas y ligandos para receptores de la superficie celular.

50 En una realización preferida adicional, se proporciona un conjugado con biotina. Por tanto, por ejemplo, se elabora un péptido biotinilado selectivamente mediante la unión de un residuo de avidina o estreptavidina portador de uno o más grupos modificadores.

Procedimientos

Además de los conjugados tratados anteriormente, la presente invención proporciona procedimientos para producir
55 estos y otros conjugados. Por tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para formar un conjugado covalente entre un residuo seleccionado y un péptido. Adicionalmente, la invención proporciona procedimientos para dirigir conjugados de la invención a un tejido concreto o a una región concreta del cuerpo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento para prevenir, curar o mejorar una patología, administrando, a un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o a un sujeto que ya tiene la enfermedad, un conjugado de la invención.

5 En realizaciones ejemplares, el conjugado se forma entre un polímero soluble en agua, un residuo terapéutico, un residuo dirigido o una biomolécula, y un péptido glucosilado o no glucosilado. El polímero, residuo terapéutico o biomolécula está conjugado al péptido mediante un grupo de unión a glucosilo intacto que se interpone entre, y se une de manera covalente, tanto al péptido como al grupo modificador (p. ej., polímero soluble en agua).

10 En una realización a modo de ejemplo, el conjugado se forma a través de un proceso químico algunas veces denominado quimioPEGilación. Un análisis adicional de la síntesis de conjugados peptídicos quimioPEGilados se proporciona en el documento PCT/US02/3226, presentado el 9 de octubre de 2002 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 10/287.994, presentada el 5 de noviembre de 2002, cada uno de ellos incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad.

15 El procedimiento incluye poner en contacto el péptido con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una glucosiltransferasa para la que el azúcar modificado es un sustrato. La reacción se realiza en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. El residuo de azúcar del azúcar modificado se selecciona preferiblemente de azúcares nucleotídicos, azúcares activados y azúcares que ni son nucleotídicos ni están activados.

20 El péptido aceptor (glucosilado o no glucosilado) se sintetiza típicamente *de novo*, o se expresa de manera recombinante en una célula procariota (p. ej., una célula bacteriana, tal como *E. coli*) o en una célula eucariota tal como una célula de mamífero (p. ej., células CHO), de levadura (p. ej., *Saccharomyces*), de insecto o vegetal. El péptido puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento. Además, el péptido puede ser un péptido de tipo silvestre o mutado. En una realización a modo de ejemplo, el péptido incluye una mutación que añade uno o más sitios de glucosilación consenso a la secuencia peptídica.

25 El procedimiento de la invención también proporciona la modificación de péptidos incompletamente glucosilados que se producen de manera recombinante. Muchas glucoproteínas producidas de manera recombinante están incompletamente glucosiladas, exponiendo los restos de hidratos de carbono que pueden tener propiedades indeseables, por ejemplo, inmunogenicidad, reconocimiento por el RES. Empleando un azúcar modificado en un procedimiento de la invención, el péptido puede glucosilarse adicionalmente de manera simultánea y derivatizarse, p. ej., con un polímero soluble en agua, un agente terapéutico o similar. El residuo de azúcar del azúcar modificado
30 puede ser el residuo que se conjugaría correctamente al aceptor en un péptido completamente glucosilado, u otro residuo de azúcar con propiedades deseables.

Los péptidos modificados por los procedimientos de la invención pueden ser péptidos sintéticos o de tipo silvestre o pueden ser péptidos mutados, producidos por procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida a sitio. Típicamente, la glucosilación de péptidos está unida a N o unida a O. Un enlace a N a modo de ejemplo es la
35 unión del azúcar modificado a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de un residuo de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas sustancias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de un azúcar (por ejemplo, N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa) a una cadena lateral hidroxilo de un hidroxiaminoácido,
40 preferiblemente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

La adición de sitios de glucosilación a un péptido o a otra estructura se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga uno o más sitios de glucosilación. La adición puede realizarse también mediante la incorporación de una o más especies que presenten un grupo-OH, preferiblemente
45 restos de serina o treonina, dentro de la secuencia del péptido (para sitios de glucosilación unidos a O). La adición puede realizarse por mutación o por síntesis química completa del péptido. La secuencia de aminoácidos peptídica se altera preferiblemente a través de cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el péptido en bases previamente seleccionadas de tal manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La una o más mutaciones del ADN se realizan preferiblemente utilizando los procedimientos
50 conocidos en la técnica.

En una realización a modo de ejemplo, el sitio de glucosilación se añade por barajado de polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican un péptido candidato pueden modularse con protocolos de barajado de ADN. El barajado de ADN es un proceso repetitivo de recombinación y mutación, realizado por fragmentación al azar de un conjunto de genes relacionado, seguido por el reensamblaje de los fragmentos mediante un proceso similar a la
55 reacción en cadena de la polimerasa. Véanse, p. ej., Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751 (1994); Stemmer, Nature 370: 389-391 (1994); y las Patentes de Estados Unidos n.º 5.605.793, 5.837.458, 5.830.721 y 5.811.238.

La presente invención también proporciona medios de adición (o eliminación) de uno o más restos de glucosilo

seleccionados en un péptido, después de lo cual un azúcar modificado se conjuga con al menos uno de los residuos de glucosilo seleccionados del péptido. La presente invención es útil, por ejemplo, cuando se desea conjugar el azúcar modificado con un resto de glucosilo seleccionado que no está presente en un péptido o no está presente en una cantidad deseada. Por tanto, antes del acoplamiento de un azúcar modificado con un péptido, el resto de glucosilo seleccionado se conjuga con el péptido mediante acoplamiento enzimático o químico. En otra realización, el patrón de glucosilación de un glucopéptido se altera antes de la conjugación del azúcar modificado mediante la retirada de un resto de hidrato de carbono del glucopéptido. Véase, por ejemplo, el documento WO 98/31826.

La adición o retirada de cualquiera de los residuos de hidrato de carbono presentes en el glucopéptido se realiza de manera química o enzimática. La desglucosilación química se lleva a cabo preferiblemente por exposición de una variante polipeptídica al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayor parte de los azúcares (o de todos ellos) a excepción del azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando al mismo tiempo intacto al péptido. La desglucosilación química la describen Hakimuddin y *col.*, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) y Edge y *col.*, Anal. Biochem. 118: 131 (1981). La escisión enzimática de los residuos de hidratos de carbono en variantes polipeptídicas puede realizarse mediante el uso de diversas endo- y exo-glucosidasas como describen Thotakura y *col.*, Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

La adición química de residuos de glucosilo se realiza mediante cualquier procedimiento reconocido en la técnica. La adición enzimática de residuos de azúcar se realiza, preferiblemente, usando una modificación de los procedimientos expuestos en la presente memoria, sustituyendo unidades de glucosilo naturales por los azúcares modificados usados en la invención. En las Patentes de Estados Unidos n.º 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554 y 5.922.577 se describen otros procedimientos de adición de residuos de azúcar.

Los puntos de unión a modo de ejemplo para los restos de glucosilo incluyen, pero no se limitan a: (a) sitios consenso para la glucosilación unida a N y glucosilación unida a O; (b) residuos de glucosilo terminales que son aceptores para una glucosiltransferasa; (c) arginina, asparagina e histidina; (d) grupos carboxilo libres; (e) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína; (f) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina; (g) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano; o (h) el grupo amida de la glutamina. Se describen ejemplos de procedimientos uso en la presente invención en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., págs. 259-306(1981).

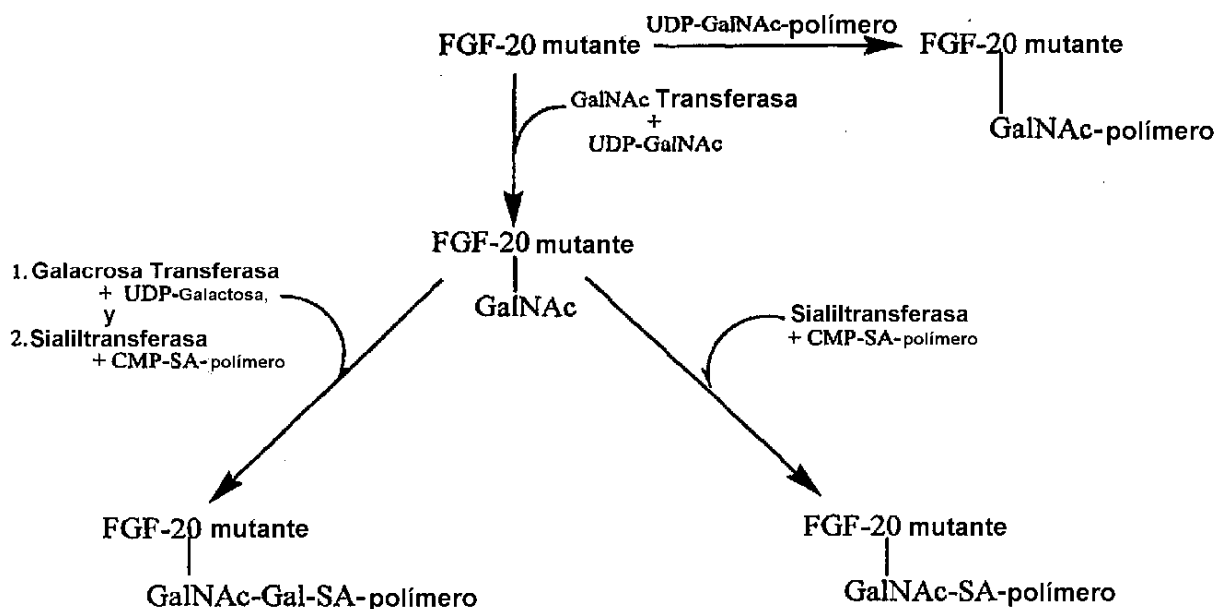
En una realización, la invención proporciona un procedimiento para unir FGF-21 y uno o más péptidos a través de un grupo enlazador. El grupo enlazador es de cualquier estructura que sea útil y puede seleccionarse de estructuras de cadena lineal y ramificada. Preferiblemente, cada extremo del enlazador, que está unido a un péptido, incluye un azúcar modificado (es decir, un grupo de unión a glucosilo intacto naciente).

En un procedimiento a modo de ejemplo de la invención, dos péptidos se unen entre sí a través de un residuo enlazador que incluye un enlazador de PEG. La construcción se adapta a la estructura general establecida en el dibujo anterior. Como se describe en la presente memoria, la construcción de la invención incluye dos grupos de unión a glucosilo intactos (es decir, $s + t = 1$). El enfoque en un enlazador de PEG que incluye dos grupos de glucosilo es a efectos de claridad y no debe interpretarse como limitante de la identidad de los brazos enlazadores de uso en esta realización de la invención.

Por tanto, un residuo de PEG está funcionalizado en un primer extremo con una primera unidad de glucosilo y un segundo extremo con una segunda unidad de glucosilo. La primera y segunda unidad de glucosilo son preferiblemente sustratos para diferentes transferasas, lo que permite la unión ortogonal del primer y segundo péptido a la primera y la segunda unidad de glucosilo, respectivamente. En la práctica, el enlazador (glucosilo)¹-PEG-(glucosilo)² se pone en contacto con el primer péptido y una primera transferasa para la cual la primera unidad de glucosilo es un sustrato, formando de este modo (péptido)¹-(glucosilo)¹-PEG-(glucosilo)². Después, opcionalmente, la glucosiltransferasa y/o el péptido sin reaccionar se eliminan de la mezcla de reacción. El segundo péptido y una segunda transferasa, para la cual la segunda unidad de glucosilo es un sustrato, se añaden al conjugado (péptido)¹-(glucosilo)¹-PEG-(glucosilo)², formando (péptido)¹-(glucosilo)¹-PEG-(glucosilo)²-(péptido)². Los expertos en la técnica apreciarán que el procedimiento diseñado anterior también es aplicable a la formación de conjugados entre más de dos péptidos usando, por ejemplo, un PEG ramificado, un dendrímero, un poli(aminoácido), un polisacárido o similar.

En el Esquema 3 se expone otra realización a modo de ejemplo. El esquema 3 muestra un procedimiento de preparación de un conjugado que comprende un polímero. El polímero aumenta la semivida en circulación de la proteína FGF.

Esquema 3



donde SA es ácido siálico y el polímero es PEG, mPEG, ácido poli siálico, un polímero soluble en agua o insoluble en agua. Aunque el procedimiento se ilustra con referencia al FGF-20 y al FGF-21, los expertos apreciarán que también puede aplicarse a otros péptidos FGF, por ejemplo, FGF-9 y FGF-18.

- 5 El uso de derivados reactivos de PEG (u otros enlazadores) para unir uno o más residuos peptídicos al enlazador está dentro del alcance de la presente invención. La invención no está limitada por la identidad del análogo de PEG reactivo. Muchos derivados activados de poli(etilenglicol) están disponibles en el comercio y en la bibliografía. Dentro de la capacidad de un experto se incluye el seleccionar, y sintetizar en caso necesario, un derivado de PEG
- 10 activado adecuado con el que producir un sustrato útil en la presente invención. Véanse, Abuchowski y col. *Cancer Biochem. Biophys.*, **7**: 175-186 (1984); Abuchowski y col., *J. Biol. Chem.*, **252**: 3582-3586 (1977); Jackson y col., *Anal. Biochem.*, **165**: 114-127 (1987); Koide y col., *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **111**: 659-667 (1983), tresilato (Nilsson y col., *Methods Enzymol.*, **104**: 56-69 (1984); Delgado y col., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12**: 119-128 (1990)); ésteres activos derivados de *N*-hidroxisuccinimida (Buckmann y col., *Makromol. Chem.*, **182**: 1379-1384(1981); Joppich y col., *Makromol. Chem.*, **180**: 1381-1384(1979); Abuchowski y col., *Cancer Biochem. Biophys.*, **7**: 175-186 (1984); Katrey col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 1487-1491 (1987); Kitamura y col., *Cancer Res.*, **51**: 4310-4315 (1991); Boccu y col., *Z. Naturforsch.*, **38C**: 94-99 (1983), carbonatos (Zalipsky y col., *POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS*, Harris, Ed., Plenum Press, Nueva York, 1992, págs. 347-370; Zalipsky y col., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **15**: 100-114 (1992); Veronese y col., *Appl. Biochem. Biotech.*, **11**: 141-152 (1985)), formiatos de imidazolilo (Beauchamp y col., *Anal. Biochem.*, **131**: 25-33 (1983); Berger y col., *Blood*, **71**: 1641-1647 (1988)), 4-ditiopiridinas (Woghiren y col., *Bioconjugate Chem.*, **4**: 314-318 (1993)), isocianatos (Byun y col., *ASAIO Journal*, M649-M-653 (1992)) y epóxidos (Patente de Estados Unidos n.º 4.806.595, concedida a Noishiki y col., (1989). Otros grupos enlazadores incluyen el enlace de uretano entre grupos amino y PEG activado. Véase, Veronese, y col., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**: 141-152 (1985).

Preparación de azúcares modificados

- 25 En general, el resto de azúcar y el grupo de modificación están unidos entre sí a través del uso de grupos reactivos, que normalmente se transforman mediante el proceso de unión en un nuevo grupo funcional orgánico o especie no reactiva en condiciones fisiológicamente pertinentes. Los grupos funcionales reactivos de azúcar se localizan en cualquier posición del resto de azúcar. Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente las que se conocen bien en la técnica de la química de bioconjugados. Las
- 30 clases de reacciones actualmente favorecidas disponibles con restos de azúcar reactivos son las que proceden en condiciones relativamente moderadas. Estas incluyen, pero no se limitan a, sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se analizan en, por
- 35 ejemplo, March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney y col., *MODIFICATION OF*

PROTEINS; Advances en Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Los grupos funcionales reactivos útiles pendientes de un núcleo de azúcar, precursor del enlazador o precursor del resto modificador polimérico incluyen, pero no se limitan a:

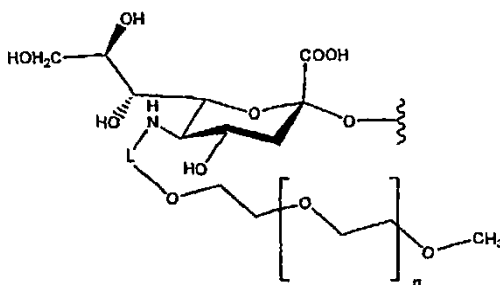
- 5 (a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos, incluidos, pero sin limitación a, éteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de acilo, acilimidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alqueno, alquino y aromáticos;
- (b) grupos hidroxilo, que se pueden convertir en, por ejemplo, ésteres, éteres, aldehídos, etc.
- 10 (c) grupos haloalquilo, en donde el haluro se puede desplazar después con un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión o un ión alcóxido, de modo que tiene como resultado la unión covalente de un grupo nuevo en el grupo funcional del átomo de halógeno;
- (d) grupos dienófilos, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder, tales como, por ejemplo grupos maleimida;
- 15 (e) grupos aldehído y cetona, de modo que es posible la derivación posterior mediante la formación de derivados carbonílicos tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o mediante mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquil-litio.
- (f) grupos de haluro de sulfonilo para la posterior reacción con aminas, por ejemplo para formar sulfonamidas;
- (g) grupos tiol, que se pueden convertir en, por ejemplo, disulfuros o reaccionar con haluros de acilo;
- h) grupos amina o sulfhidrilo que pueden ser, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados;
- 20 (i) alquenos, que pueden sufrir, por ejemplo, cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc., y
- (j) epóxidos que pueden reaccionar con, por ejemplo, aminas y compuestos hidroxilo.

Los grupos funcionales reactivos se pueden elegir de un modo tal que no participen ni interfieran en las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o el grupo modificador. Como alternativa, un grupo funcional reactivo se puede proteger de participar en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica entenderán cómo proteger un grupo funcional concreto de un modo tal que no interfiera en un conjunto seleccionado de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo Greene y col., PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

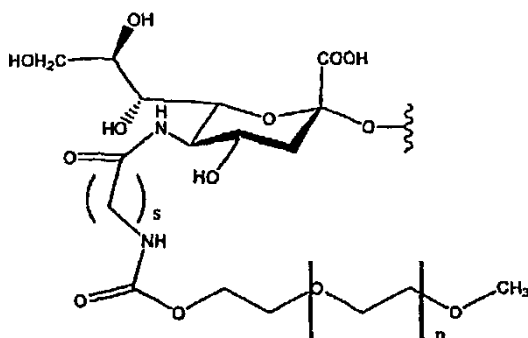
En el análisis que se indica a continuación, se exponen una serie de ejemplos específicos de azúcares modificados que son útiles en la práctica de la presente invención. En las realizaciones de ejemplo se usa un derivado de ácido siálico como núcleo del azúcar al que se une el grupo modificador. El centro del debate sobre derivados de ácido siálico se proporciona únicamente a efectos de la claridad de la ilustración y no debe interpretarse para limitar el alcance de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden activar u derivar diversos restos de azúcar de un modo análogo al expuesto usando ácido siálico como ejemplo. Por ejemplo, están disponibles numerosos procedimientos para modificar galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y mucosa, por nombrar algunos sustratos de azúcar que se modifican con facilidad mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Elhalabi y col., Curr. Med. Chem. 6: 93 (1999); y Schafer y col., J. Org. Chem. 65: 24 (2000).

En una realización ejemplar, el péptido que se modifica por un procedimiento de la invención es un glucopéptido que se produce en células procariotas (por ejemplo, *E.coli*), células eucariotas, incluyendo levadura y células de mamífero (por ejemplo, células CHO), o en un animal transgénico y, por lo tanto, contiene cadenas de oligosacárido unidas a N y/o O, que están sometidas a sialilo de forma incompleta. Las cadenas de oligosacárido del glucopéptido que carecen de un ácido siálico y que contienen un resto galactosa terminal pueden PEG-arse, PPG-arse o modificarse de otro modo con un ácido siálico modificado.

El derivado de ácido PEG-siálico ejemplar incluyen:



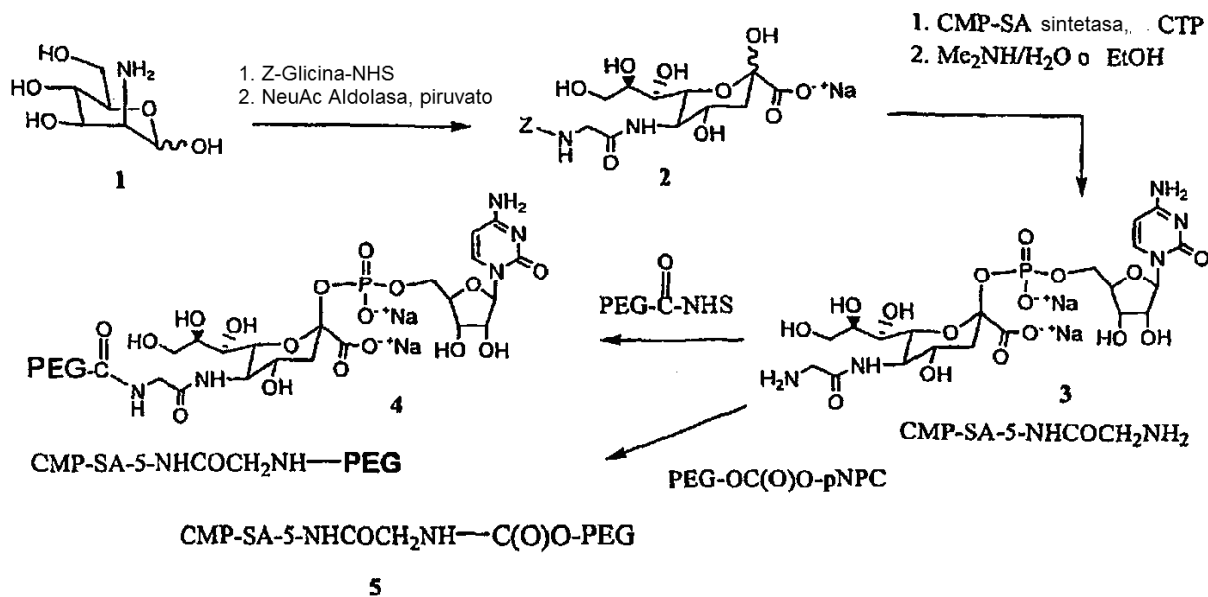
en la que L es un resto enlazador de alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir que une el residuo de ácido siálico y el residuo PEG, y "n" es 1 o más; y



en la que el índice "s" representa un número entero de 0 a 20, y "n" es 1 o mayor.

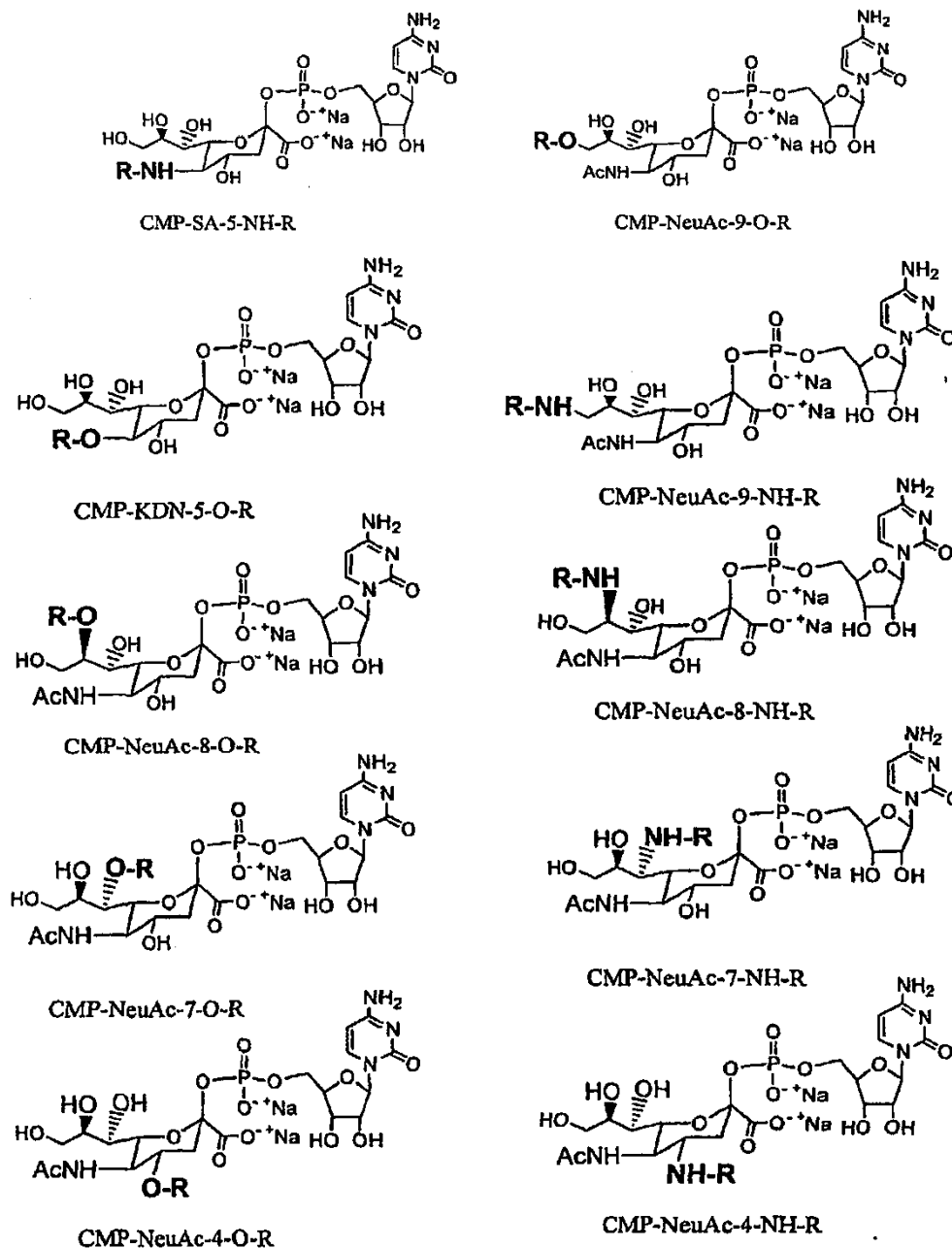
- 5 En el Esquema 4, el amino glucósido **1**, se trata con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (por ejemplo, glicina), que convierte el resto de azúcar amina en el correspondiente aducto de amida de aminoácido protegido. El aducto se trata con una aldolasa para formar α -hidroxicarboxilato **2**. El compuesto **2** se convierte en el correspondiente derivado de CMP mediante la acción de la CMP-SA sintetasa seguido de la hidrogenación catalítica del derivado de CMP para producir el compuesto **3**. La amina introducida mediante la formación del aducto de glicina se usa como un locus de unión de PEG haciendo reaccionar el compuesto **3** con un derivado de PEG o PPG activado (por ejemplo, PEG-C(O)NHS, PEG-OC(O)O-p-nitrofenilo), produciendo especies tales como **4** o **5**, respectivamente.
- 10

Esquema 4



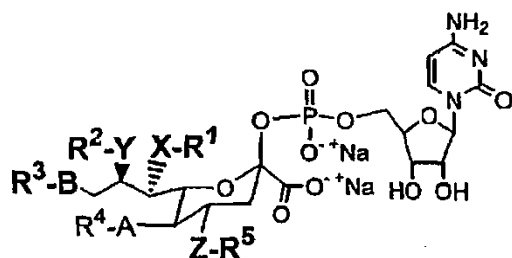
- 15 La Tabla 1 expone ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que se derivan con un grupo de modificación, tal como un residuo PEG o PPG. Los péptidos del factor de crecimiento de fibroblastos pueden modificarse por el método del Esquema 1. Se preparan otros derivados mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Keppler y col., Glycobiology 11: 11R (2001); y Charter y col., Glycobiology 10: 1049 (2000). Otros análogos de PEG y PPG reactivos de amina se encuentran disponibles en el mercado, o se pueden preparar mediante métodos fácilmente accesibles por parte del experto en la técnica.

Tabla 1



5 en donde R representa un grupo de modificación, por ejemplo, PEG lineal o ramificado o $-L^x-R^x$ en la que L^x es un enlazador seleccionado de un enlace (orden cero), alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir, y R^x es el grupo de modificación.

Los fosfatos de azúcar modificados para su uso en la práctica de la presente invención pueden estar sustituidos en otras posiciones, así como también las que se han expuesto anteriormente. Actualmente, las sustituciones preferidas de ácidos siálico se exponen en la Fórmula I:



(I)

en la que X es un grupo de enlace, que se selecciona preferiblemente de -O-, -N(H)-, -S, CH₂- y -N(R)₂, en la que cada R es un miembro seleccionado independientemente de R¹-R⁵. Los símbolos Y, Z, A y B representan cada uno un grupo que se selecciona entre el grupo que se ha expuesto anteriormente para la identidad de X. Cada uno de X, Y, Z, A y B se selecciona independientemente y, por lo tanto, pueden ser iguales o diferentes. Los símbolos R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ representan H, un polímero soluble en agua, un residuo terapéutico, una biomolécula, u otro residuo. Como alternativa, estos símbolos representan un enlazador que está unido a un polímero soluble en agua, un residuo terapéutico, una biomolécula, u otro residuo.

Los residuos ejemplares unidos a los conjugados descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, derivados de PEG (por ejemplo, alquil-PEG, acil-PEG, acil-alquil-PEG, alquil-acil-PEG carbamoil-PEG, aril-PEG), derivados de PPG (por ejemplo, alquil-PPG, acil-PPG, acil-alquil-PPG, alquil-acil-PPG carbamoil-PPG, aril-PPG), residuos terapéuticos, residuos de diagnóstico, manosa-6-fosfato, heparina, heparano, SLe_x, manosa, manosa-6-fosfato, Sialil Lewis X, FGF, VFGF, proteínas, condroitina, queratán, dermatán, albúmina, integrina, oligosacáridos antenales, péptidos y similares. Los métodos para conjugar los diversos grupos modificadores con un residuo sacárido son fácilmente accesibles para los expertos en la técnica (POLY (ETHYLENE GLYCOL CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series No. 680, American Chemical Society, 1997; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; y Dunn y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Grupos de Reticulación

La preparación del azúcar modificado para su uso en los métodos de la presente invención incluye la unión de un grupo de modificación a un resto de azúcar y la formación de un aducto estable, que es un sustrato para glucosiltransferasa. El azúcar y el grupo de modificación se pueden acoplar mediante un agente de reticulación de orden cero o superior. Los compuestos bifuncionales a modo de ejemplo que se pueden usar para unir los grupos de modificación a los residuos de carbohidrato incluyen, pero no se limitan a, poli(etilenglicoles) bifuncionales, poliamidas, poliéteres, poliésteres y similares. Los enfoques generales para la unión de carbohidratos a otras moléculas se conocen en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Lee y col., Biochemistry 28: 1856 (1989); Bhatia y col., Anal. Biochem. 178: 408 (1989); Janda y col., J. Am. Chem. Soc. 112: 8886 (1990) y Bednarski y col., documento WO 92/18135. En el análisis siguiente, los grupos reactivos se tratan como benignos en el residuo de azúcar del azúcar modificado creciente. El foco del análisis es por cuestiones de claridad de ilustración. Los expertos en la técnica apreciarán que la discusión también resulta relevante para los grupos reactivos del grupo de modificación.

Se usan varios reactivos para modificar los componentes del azúcar modificado con reticulaciones químicas intramoleculares (para revisiones de los reactivos de reticulación y procedimientos de reticulación véase: Wold, F., Meth. Enzymol. 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H., y Cooney, D. A., En: ENZYMES AS DRUGS. (Holcenberg, y Roberts, eds.) págs. 395-442, Wiley, Nueva York, 1981; Ji, T. H., Meth. Enzymol. 91: 580-609, 1983; Mattson y col., Mol. Biol. Rep. 17: 167-183, 1993, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia). Los reactivos de reticulación preferidos se obtienen a partir de diversos reactivos de reticulación de longitud cero, homobifuncionales y heterobifuncionales. Los reactivos de reticulación de longitud cero incluyen conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un enlace disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son los reactivos que inducen la condensación de un grupo carboxilo y amino primario para formar un enlace de amida tal como las carbodiimidas, etilcloroformiato, reactivo de Woodward K (2-etil-5-fenilisoaxazolio-3'-sulfonato) y carbonildiimidazol. Además de estos reactivos químicos, se puede usar la enzima transglutaminas (glutamil-péptido γ -glutamyltransferasa; EC 2.32.13) como reactivo de reticulación de longitud cero. Esta enzima cataliza las reacciones de transferencia de acilo en los grupos carboxamida de restos de glutamilo unidos a proteína, normalmente con un grupo amino primario como sustrato. Los reactivos homo- y hetero-bifuncionales preferidos contienen dos sitios disimilares o idénticos, respectivamente, que pueden ser reactivos frente a amino, sulfhidrilo, guanidino, indol o grupos no específicos

En otra realización más, los grupos fotoactivables se seleccionan de diazopiruvatos. Por ejemplo, el p-nitrofenil éster de diazopiruvato de p-nitrofenilo reacciona con aminas alifáticas para dar amidas del ácido diazopirúvico que se someten a fotólisis ultravioleta para formar aldehídos. El componente de afinidad modificado con diazopiruvato fotolizado reaccionará como retulaciones de formación de formaldehído o glutaraldehído.

Grupos de Enlazador Escindibles

En una realización adicional más, el grupo de enlazador se proporciona con un grupo que puede escindirse para liberar el grupo de modificación del resto de azúcar. Se conocen muchos grupos escindibles en la técnica. Véase, por ejemplo, Jung y col., Biochem. Biophys. Acta 761: 152-162 (1983); Joshi et al., J. Biol. Chem. 265: 14518-14525 (1990); Zarlring et al., J. Immunol. 124: 913-920 (1980); Bouzair et al., Eur. J. Biochem. 155: 141-147 (1986); Park et al., J. Biol. Chem. 261: 205-210 (1986); Browning et al., J. Immunol. 143: 1859-1867 (1989). Además una amplia gama de grupos de enlazador bifuncionales escindibles (tanto homo- como hetero-bifuncionales) se encuentra disponible en el mercado a partir de proveedores tales como Pierce.

Los restos escindibles a modo de ejemplo se pueden escindir usando luz, calor o reactivos tales como tioles, hidroxilamina, bases, peryodato y similares. Además, determinados grupos preferidos se escinden *in vivo* en respuesta al procedimiento de endocitosis (por ejemplo, *cis*-aconitilo; véase, Shen y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 1048 (1991)). Los grupos escindibles preferidos comprenden un resto escindible que es un miembro seleccionado del grupo que consiste en grupos disulfuro, éster, imida, carbonato, nitrobenzilo, fenacilo y benzoína.

Conjugación de azúcares modificados con péptidos

Los azúcares modificados se conjugan con un péptido glucosilado o no glucosilado usando una enzima apropiada para mediar la conjugación. Preferentemente, las concentraciones del azúcar (o azúcares) donante modificado, enzima (o enzimas) y péptido (o péptidos) aceptor se seleccionan de tal manera que la glucosilación transcurra hasta que se consuma el aceptor. De manera general, las consideraciones analizadas a continuación, al tiempo que se exponen en el contexto de una sialiltransferasa, son aplicables a otras reacciones glucosiltransferasa.

Se conocen varios métodos para usar glucosiltransferasas para sintetizar estructuras de oligosacáridos deseadas y, de manera general, son aplicables a la presente invención. Se describen procedimientos a modo de ejemplo, por ejemplo, en el documento WO 96/32491, Ito y col., *Pure Appl. Chem.* 65: 753 (1993), y las Pat. de Estados Unidos n.º 5.352.670, 5.374.541 y 5.545.553.

La presente invención se pone en práctica usando una única glucosiltransferasa o una combinación de glucosiltransferasas. Por ejemplo, se puede usar una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En aquellas realizaciones que usan más de una enzima, preferentemente las enzimas y los sustratos se combinan en una mezcla de reacción inicial, o se añaden las enzimas y los reactivos, para una segunda reacción enzimática, al medio de reacción una vez que la primera reacción enzimática esta completada o casi completada. Realizando dos reacciones enzimáticas secuenciales en un único recipiente, se mejoran los rendimientos totales con respecto a los procedimientos en los cuales se asila una especie intermedia. Además, se reduce la limpieza y la eliminación de disolventes extra y sub-productos.

En una realización preferida, tanto la primera como la segunda enzima son una glucosiltransferasa. En otra realización preferida, una enzima es una endoglucosidasa. En una realización preferida adicional, se usan más de dos enzimas para ensamblar la glucoproteína utilizada de la invención. Las enzimas se usan para modificar la estructura sacárido sobre el péptido en cualquier punto, bien antes o después de la adición del azúcar modificado al péptido.

En otra realización, el procedimiento utiliza una o más exo- o endoglucosidasa. Normalmente, la glucosidasa es un mutante, que se diseña para formar enlaces glucosílicos en lugar de producir su escisión. Normalmente, la glucanasa mutante incluye una sustitución de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido ácido de sitio activo. Por ejemplo, cuando la endoglucanasa es endo-H, normalmente los restos de sitio activo sustituidos serán Asp en la posición 130, Glu en la posición 132 o combinación de los mismos. De manera general, los aminoácidos se reemplazan con serina, alanina, asparagina o glutamina.

La enzima mutante cataliza la reacción, normalmente mediante una etapa de síntesis que es análoga a la reacción inversa de la etapa de hidrólisis de endoglucanasa. En estas realizaciones, la molécula donante de glucosilo (por ejemplo, una estructura de oligo- o mono-sacárido deseada) contiene un grupo saliente y la reacción transcurre con la adición de la molécula donante al resto GlcNAc de la proteína. Por ejemplo, el grupo saliente puede ser un halógeno, tal como flúor. En otras realizaciones, el grupo saliente es un residuo de Asn, o un residuo de Asn-péptido. En otras realizaciones adicionales, se modifica el resto de GlcNAc sobre la molécula donante de glucosilo. Por ejemplo, el resto de GlcNAc puede comprender un resto de 1, 2-oxazolina.

En una realización preferida, cada una de las enzimas utilizadas para producir un conjugado de la invención se encuentra presente en cantidad catalítica. La cantidad catalítica de la enzima particular varía de acuerdo con la concentración de ese sustrato enzimático así como con las condiciones de reacción, tales como la temperatura, tiempo y valor de pH. Los medios para determinar la cantidad catalítica para una enzima determinada en concentraciones de sustrato preseleccionadas y las condiciones de reacción se conocen bien por los expertos en la técnica.

La temperatura a la que se realiza el proceso anterior puede variar desde justo por encima de congelación hasta la temperatura a la que la enzima más sensible se desnaturaliza. Los intervalos de temperatura preferidos son de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 55 °C, y más preferentemente de aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 30 °C. En otra realización a modo de ejemplo, uno o más componentes del presente método se realizan a una temperatura elevada usando una enzima termófila.

Se mantiene la mezcla de reacción durante un período de tiempo suficiente como para que el aceptor experimente glucosilación, formando de este modo el conjugado deseado. Con frecuencia, parte del conjugado puede detectarse después de unas algunas horas, obteniéndose normalmente cantidades recuperables a las 24 horas o menos. Los expertos en la técnica comprenden que la velocidad de reacción depende de diversos factores variables (por ejemplo, la concentración de la enzima, la concentración del donante, la concentración del aceptor, la temperatura, el volumen de disolvente) que se optimizan para un sistema seleccionado.

La presente invención también proporciona la producción a escala industrial de péptidos modificados. Como se emplea en esta memoria, de manera general, una escala industrial produce al menos aproximadamente 250 mg, preferentemente al menos aproximadamente 500 mg, y más preferentemente al menos aproximadamente 1 gramo de conjugado purificado, acabado, preferentemente tras un solo ciclo de reacción, es decir, el conjugado no es una combinación de los productos de reacción procedentes de ciclos de síntesis idénticos, repetidos de forma consecutiva.

En el siguiente análisis, la invención se ilustra por la conjugación de restos de ácido siálico modificado con un péptido glucosilado. Se marca el ácido siálico modificado a modo de ejemplo con m-PEG. El enfoque del siguiente análisis sobre el uso de ácido siálico modificado con PEG y péptidos glucosilados es por motivos de claridad de ilustración y no pretende implicar que la invención se limita a la conjugación de estos dos compañeros. Un experto comprende que, de manera general, el análisis resulta aplicable a las adiciones de restos glucosilo modificados diferentes de ácido siálico. Además, el análisis también puede aplicarse a la modificación de una unidad de glucosilo con agentes diferentes de PEG, que incluyen otros polímeros solubles en agua, restos terapéuticos y biomoléculas.

Se puede usar un procedimiento enzimático para la introducción selectiva de carbohidratos PEGilados o PPGilados sobre un péptido o glucopéptido. El método utiliza azúcares modificados que contienen PEG, PPG, o un grupo funcional reactivo enmascarado, y se combina con la glucosiltransferasa o glucosintasa apropiada. Seleccionando la glucosiltransferasa que proporcionará la unión de carbohidrato deseado y utilizando, como sustrato donante, el azúcar modificado, puede introducirse el PEG o PPG directamente sobre la cadena principal peptídica, sobre los restos glucídicos existentes de un glucopéptido o sobre los restos glucídicos que se han añadido a un péptido.

Un aceptor para la sialiltransferasa está presente en el péptido a modificar mediante los métodos de la presente invención en forma de una estructura de origen natural o una colocada allí de forma recombinante, enzimática o químicamente. Los aceptores adecuados incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo, tales como Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, lacto-N-tetraosa, Gal β 1,3GlcNAc, GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (lactosa), y otros aceptores conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Paulson y col., J. Biol. Chem. 253: 5617-5624 (1978)).

En una realización, un aceptor para la sialiltransferasa está presente en el glucopéptido a modificar tras la síntesis *in vivo* del glucopéptido. Dichos glucopéptidos se puede someter a sialilación usando los métodos reivindicados sin modificación previa del patrón de glucosilación del glucopéptido. Como alternativa, se pueden usar los métodos de la invención para someter a sialilación un péptido que no incluye un aceptor apropiado; en primer lugar se modifica el péptido para que incluya un aceptor mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. En una realización ejemplar, se añade un resto GalNAc por la acción de una GalNAc transferasa.

En una realización a modo de ejemplo, el aceptor de galactosilo se ensambla mediante la unión de un resto de galactosa a un aceptor apropiado unido al péptido, por ejemplo, GalNAc. El método incluye incubar el péptido a modificar con una mezcla de reacción que contenga una cantidad apropiada de galactosiltransferasa (por ejemplo, Gal β 1,3 o Gal β 1,4), y un donante de galactosilo apropiado (por ejemplo, UDP-galactosa). Se permite que la reacción transcurra sustancialmente hasta que se complete o, como alternativa, la reacción concluye cuando se añade una cantidad preseleccionada del resto de galactosa. Otros métodos de ensamblaje de un aceptor de sacárido apropiado resultarán obvios para los expertos en la técnica.

En otra realización más, en primer lugar se "recortan" los oligosacáridos unidos a glucopéptido, para exponer un aceptor para la sialiltransferasa o un resto al cual se añaden uno o más restos apropiados para obtener un aceptor apropiado. Las enzimas, tales como glucosiltransferasas y endoglucosidasas, (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.716.812) resultan útiles para las reacciones de unión y recorte.

En el análisis que se indica a continuación, el método de la invención se ilustra por el uso de azúcares modificados que tienen un polímero soluble en agua unido a los mismos. El enfoque del análisis es con fines de ilustración. Los expertos apreciarán que el análisis es igualmente pertinente a las realizaciones en las que el azúcar modificado tiene un residuo terapéutico, una biomolécula, o similar.

En una realización a modo de ejemplo, se "recorta" un resto carbohidrato unido a O antes de la adición del azúcar modificado. Por ejemplo, un resto de GalNAc-Gal se recorta de nuevo para obtener GalNAc. Se conjuga un azúcar modificado que lleva el polímero soluble en agua con uno o más de los restos de azúcar expuestos al "recorte". En un ejemplo, se "recorta" un glucopéptido y se añade un polímero soluble en agua al aminoácido de cadena lateral-O o glucopéptido glicano a través de un resto sacarilo, por ejemplo, un resto de Sia, Gal o GalNAc conjugado con el polímero soluble en agua. El resto sacarilo modificado se puede unir a un sitio aceptor en el glucopéptido "recortado". Como alternativa, se puede añadir un resto sacarilo no modificado, por ejemplo Gal, en el extremo del glicano unido a O.

En otra realización a modo de ejemplo, se añade un polímero soluble en agua un resto de GalNAc mediante un azúcar modificado que tiene un resto de galactosa. Como alternativa, se puede añadir un Gal no modificado al resto de GalNAc terminal.

En otro ejemplo adicional, usando un ácido siálico modificado, se añade un polímero soluble en agua, ramificado

sobre un resto de Gal.

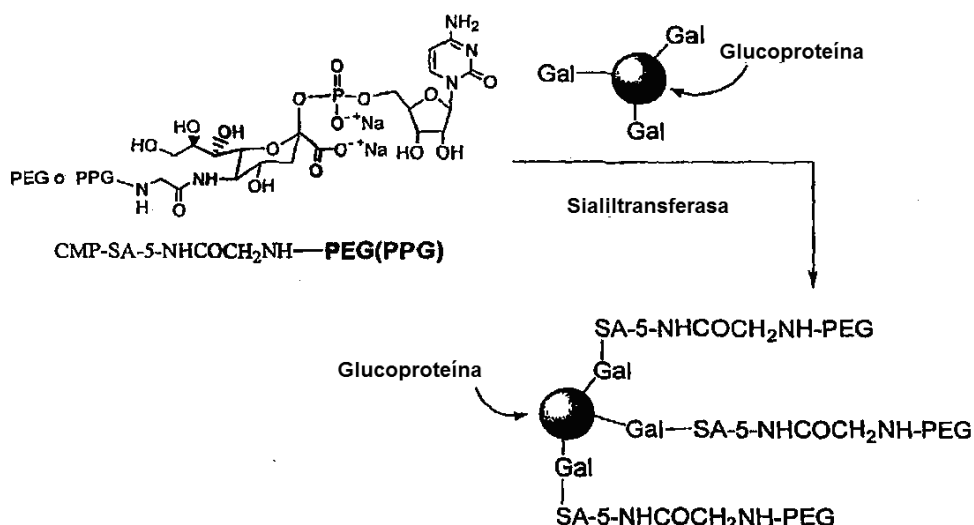
En otra realización a modo de ejemplo, se "recorta de nuevo" un resto glucosilo unido a O al GalNAc unido al aminoácido. En un ejemplo, se añade un polímero soluble en agua a través de un Gal modificado con el polímero. Como alternativa, se añade Gal no modificado al GalNAc seguido de un Gal con un polímero soluble en agua unido.

5 En otra realización más, se añaden uno o más restos de Gal no modificado al GalNAc seguido de un resto de ácido siálico modificado con un polímero soluble en agua.

Usando los métodos de la invención, es posible un "recortar de nuevo" y formar un resto de carbohidrato de sustancialmente cualquier estructura deseada. El azúcar modificado puede añadirse a los extremos del resto de carbohidrato como se ha expuesto anteriormente, o este puede ser un producto intermedio entre el núcleo peptídico y el extremo del carbohidrato.

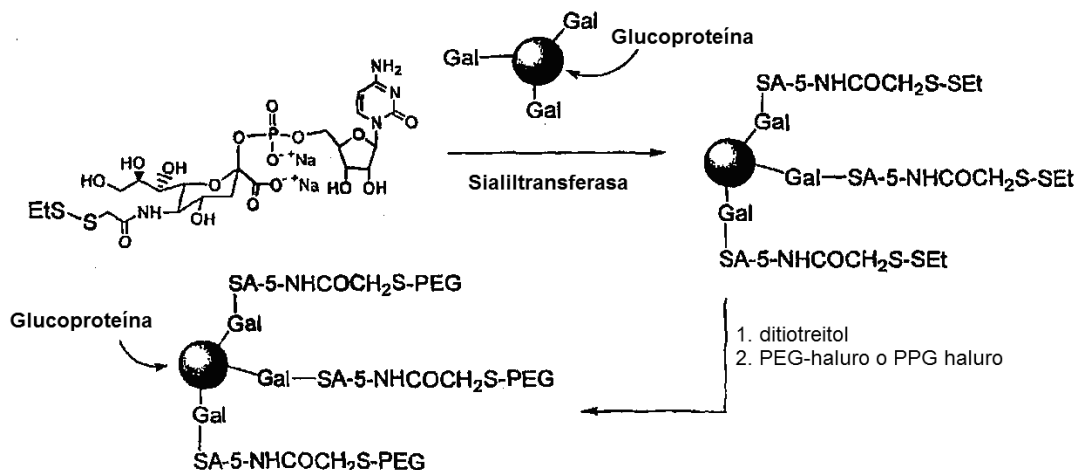
10 En una realización a modo de ejemplo, se añade el polímero soluble en agua a un resto de Gal terminal usando un ácido siálico modificado con polímero. Se usa una sialiltransferasa apropiada para añadir un ácido siálico modificado. El procedimiento se resume en el Esquema 5.

Esquema 5



15 En otra estrategia adicional, resumida en el Esquema 6, se presenta una funcionalidad reactiva enmascarada en el ácido siálico. Preferentemente, el grupo reactivo enmascarado no se ve afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al péptido. Tras la unión covalente del ácido siálico modificado al péptido, se elimina el enmascaramiento y se conjuga el péptido con un agente tal como PEG, PPG, un resto terapéutico, una biomolécula u otro agente. El agente se conjuga con el péptido de una manera específica mediante su reacción con el grupo reactivo no enmascarado en el resto glucídico modificado.

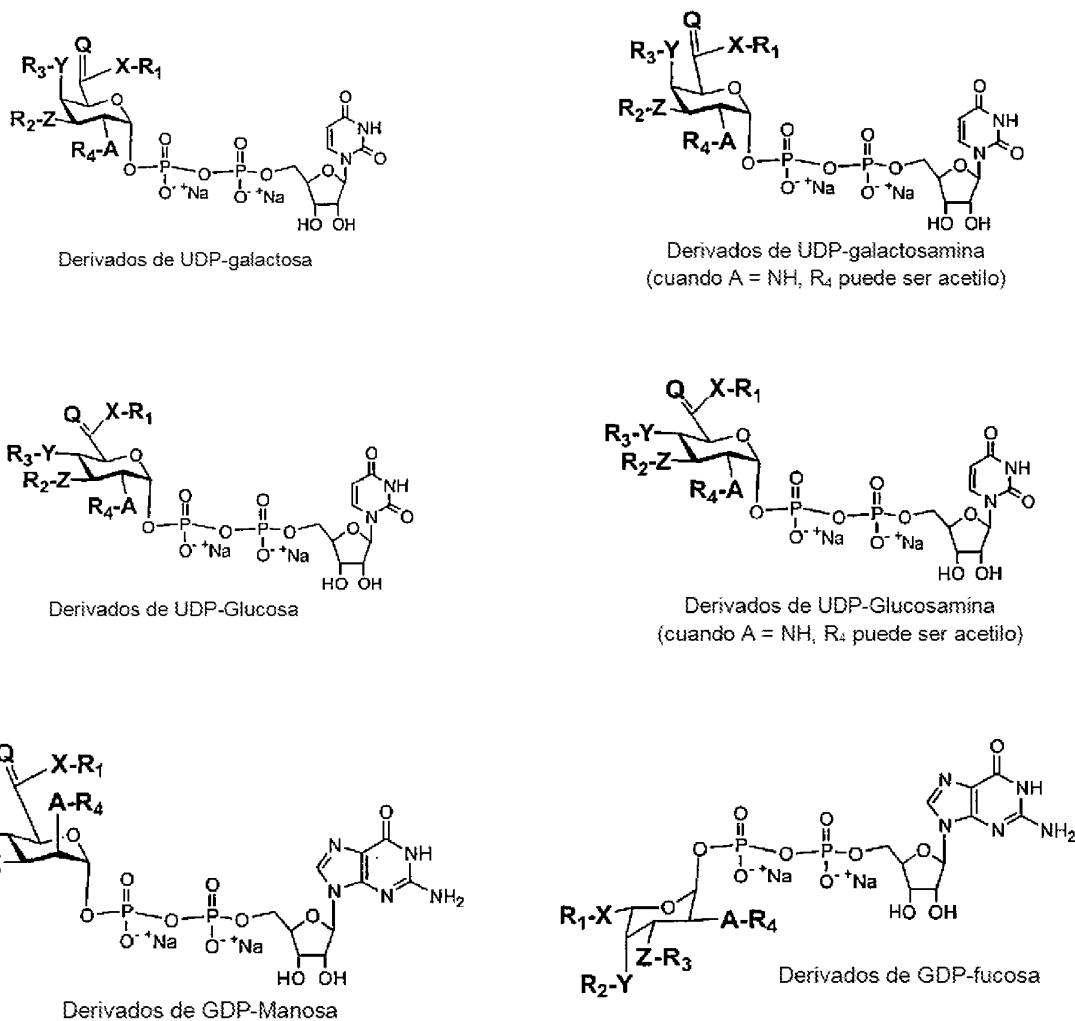
Esquema 6



Se puede usar cualquier azúcar modificado con su glucosiltransferasa apropiada, dependiendo de los azúcares terminales de las cadenas laterales de oligosacárido del glucopéptido (Tabla 2). Como se ha analizado

anteriormente, el azúcar terminal del glucopéptido necesario para la introducción de la estructura PEGilada o PPGilada puede introducirse de forma natural durante la expresión o se puede producir después de la expresión usando la glucosidasa o glucosidasas apropiadas, glucosiltransferasa o glucosiltransferasas apropiadas, o mezcla de glucosidasa o glucosidasas y glucosiltransferasa o glucosiltransferasas.

5 **Tabla 2**



X = O, NH, S, CH₂, N-(R₁₋₅)₂, Y=X; Z=X; A=X; B=X.

Q = H₂, O, S, NH, N-R.

R, R₁₋₄ = H, Enlazador-M, M.

M = Ligando de interés

Ligando de interés = acil-PEG, acil-PPG, alquil-PEG, acil-alquil-PEG, acil-alquil-PEG, carbamoil-PEG, carbamoil-PPG, PEG, PPG, acil-aril-PEG, acil-aril-PPG, aril-PEG, aril-PPG, Manosa₆-fosfato, heparina, heparano, SLex, Manosa, FGF, VFGF, proteína, condroitina, queratán, dermatán, albúmina, integrinas, péptidos, etc.

10

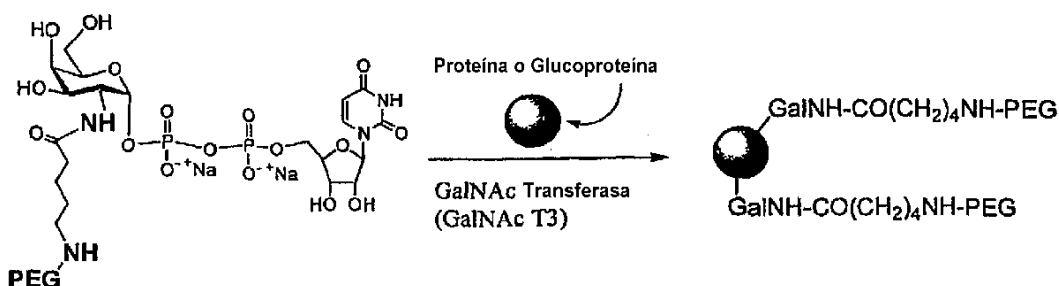
En una realización a modo de ejemplo adicional, UDP-galactosa-PEG reacciona con β1,4-galactosiltransferasa de leche bovina, de modo que la galactosa modificada se transfiera a la estructura de N-acetilglucosamina terminal adecuada. Los residuos terminales de GlcNAc sobre el glucopéptido pueden producirse durante la expresión, como puede pasar en sistemas de expresión tales como de mamíferos, insectos, plantas u hongos, pero también pueden producirse tratando el glucopéptido con una sialidasa y/o glucosidasa y/o glucosiltransferasa, según sea necesario.

En otra realización a modo de ejemplo, se usa una GlcNAc transferasa, tal como GNT1-5, para transferir la GlcN PEGilada a un resto de manosa terminal en un glucopéptido. En una realización a modo de ejemplo adicional, las estructuras de glucano unidas a N y/o unidas a O se eliminan enzimáticamente de un glucopéptido para exponer un

resto de aminoácido o un residuo de glucosilo terminal que después se conjuga con el azúcar modificado. Por ejemplo, se usa una endoglucanasa para eliminar las estructuras unidas a N de un glucopéptido para exponer una GlcNAc terminal, como una GlcNAc unida a Asn, en el glucopéptido. La UDP-Gal-PEG y la galactosiltransferasa adecuada se usan para introducir la funcionalidad PEG o PPG-galactosa en la GlcNAc expuesta.

- 5 En una realización alternativa, el azúcar modificado se añade directamente a la estructura peptídica usando una glucosiltransferasa que se sabe que transfiere residuos de azúcar a la estructura peptídica. Esta realización a modo de ejemplo se expone en el Esquema 7. Las glucosiltransferasas a modo de ejemplo útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, GalNAc transferasas (GalNAc T1-20), GlcNAc transferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de esta estrategia permite la adición directa de azúcares modificados a péptidos que carecen de cualquier hidrato de carbono o, como alternativa, a los glucopéptidos existentes. En ambos casos, la adición del azúcar modificado se produce en posiciones específicas en la estructura peptídica, como se define mediante la especificidad de sustrato de la glucosiltransferasa y no de un modo aleatorio como se produce durante la modificación de la estructura peptídica de una proteína usando procedimientos químicos. Se puede introducir una serie de agentes en las proteínas o glucopéptidos que carecen de la secuencia peptídica del sustrato de la glucosiltransferasa sometiendo a modificación por ingeniería genética la secuencia de aminoácidos adecuada en la cadena polipeptídica.

Esquema 7



- En cada una de las realizaciones a modo de ejemplo anteriores se puede usar una o más etapas adicionales de modificación química o enzimática tras la conjugación del azúcar modificado con el péptido. En una realización a modo de ejemplo, se usa una enzima (p. ej., fucosiltransferasa) para agregar una unidad de glucosilo (p. ej., fucosa) sobre el azúcar modificado terminal unido al péptido. En otro ejemplo, se usa una reacción enzimática para "proteger" (p. ej., sialilar) sitios con los que el azúcar modificado no se ha podido conjugar. Como alternativa, para alternar la estructura del azúcar modificado conjugado se usa una reacción química. Por ejemplo, el azúcar modificado conjugado reacciona con agentes que estabilizan o desestabilizan su unión con el componente peptídico al que está unido el azúcar modificado. En otro ejemplo, un componente del azúcar modificado se desprotege tras su conjugación con el péptido. Un experto apreciará que hay una serie de procedimientos enzimáticos y químicos que son útiles en los procedimientos de la invención en una fase posterior a la conjugación del azúcar modificado con el péptido. La elaboración posterior del conjugado azúcar modificado-péptido está dentro del alcance de la invención.

30 Clases de enzimas

- Los aspectos de la presente invención hacen uso de enzimas que forman un enlace entre un residuo de acilo activado y un heteroátomo encontrado en un núcleo de azúcar. Las enzimas útiles en la realización práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, proteasas, lipasas, esterases, acilasas, aciltransferasas, glucosiltransferasas, sulfotransferasas, glucosidasas y similares, de tipo silvestre y mutante. Un ejemplo de un mutante es uno donde se altera uno o más restos de aminoácido en el sitio activo para proporcionar una enzima con actividad sintética que se mejora con respecto a la actividad en la enzima de tipo silvestre correspondiente.

Transferencia de acilos

- El descubrimiento de que algunas enzimas son catalíticamente activas en disolventes orgánicos, ha ampliado enormemente su uso como biocatalizadores. En este medio, estas enzimas muestran un nuevo comportamiento catalítico. Por ejemplo, las lipasas catalizan las reacciones de esterificación y transesterificación en medios orgánicos. Estas propiedades permiten la producción de compuestos que son difíciles de obtener usando procedimientos químicos.

Proteasas

- En algunas realizaciones de la invención se emplea una proteasa. Las proteasas son conocidas en la técnica por catalizar la unión de aminoácidos con azúcares a través de la esterificación. (Davis, (documento WO 03/014371, publicado el 20 de febrero del 2003). En esta publicación, un grupo aminoácido de éster vinílico reaccionó con un

5 acceptor acilo de hidrato de carbono en presencia de la serina proteasa subtilisina procedente de *Bacillus lentus*. Adicionalmente, las proteasas de tipo silvestre pueden aislarse de *Bacillus amyloliquefaciens*. Pueden crearse proteasas mutantes según las enseñanzas, por ejemplo, de las Publicaciones PCT n.º WO 95/10615 y WO 91/06637, que se incorporan por referencia en la presente memoria. Otras proteasas de uso en la presente invención incluyen serina proteasas (tales como quimi tripsina, plasmina y trombina), cisteína proteasas (tales como cathepsina B y papaína) y aspártico endopeptidasas (tales como pepsina A, quimosina, cathepsina D, asparagenasa).

En una realización ejemplar, utilizando una proteasa, la unión entre el residuo de azúcar y el grupo modificador es un aminoácido que está derivatizado con el grupo modificador. El azúcar y el aminoácido se unen mediante un residuo de amida formado por la proteasa.

10 **Lipasas**

En algunas realizaciones de la invención se usa una lipasa. Anteriormente se ha descrito el uso de lipasas en la acilación de sacáridos. Por ejemplo, las acilaciones regioselectivas de alquil β -D-xilopiranosidos usando lipasa PS en disolventes orgánicos la describió Lopez. (Lopez y col., J. Org. Chem., **59**, 7027-7032 (1994)). Otro grupo también utilizó lipasa PS para catalizar la transferencia de grupos acetilo sobre ácidos siálicos en vinil acetato. (Lo y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., **9**, 709-712 (1999)). La acilación de disacáridos regioselectiva en alcohol *tert*-butílico catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* también se ha descrito. (Woudenberg van-Oosterom y col., Biotechnol. Bioeng., **49**, 328-333 (1996)). También se han usado versiones inmovilizadas de la lipasa de *Candida antarctica* para acilar hidropopil celulosa en *tert*-butanol. (Sereti y col., Biotechnol Bioeng., **72(4)**, 495-500 (2001)). Otras lipasas de uso en la presente invención incluyen lipoproteína lipasa, triaglicérol lipasa, diglicérido lipasa y posheparina lipasa.

20 **Esterasas**

En algunas realizaciones de la invención también pueden emplearse esterasas. Se observó que la acetilación de la celobiosa y de la celulosa se catalizaba en medio acuoso en presencia de isopropenil acetato mediante una carboxilesterasa intracelular de *Arthrobacter viscosus*. (Cui y col., Enzyme Microb. Technol., **24**, 200-208 (1999)). Otro grupo acetiló los grupos amino de quitobiosa y quitotetraosa en una solución acuosa de acetato de sodio 3M usando una quitin desacetilasa de *Colletotrichum lindemuthianum* (Tokuyasu y col., Carbohydr. Res., **322**, 26-31 (1999)). Un tercer grupo utilizó acetilxilán esterasa (AcXE) de *Schizophyllum commune* para catalizar la transferencia del grupo acetilo a metil β -D-xilopiranosido, metil β -D-celobiósido, metil β -D-glucopiranosido, celotetraosa, 2-desoxi-D-glucosa, D-manosa, β -1,4-manobiosa, β -1,4-manopentaosa, β -1,4-manohexaosa, β -1,4-xilobiosa y β -1,4-xilopentaosa. (Biely y col., Biochimica et Biophysica Acta, **1623**, 62-71 (2003)). La acetilación de alcoholes secundarios también se realizó por transesterificación de vinil acetato mediante una feruloil esterasa de *Humicola insolens*. (Hatzakis y col., J. Mol. Catal., B Enzym. **21**, 309-311 (2003)). Otras esterasas de uso en la presente invención incluyen colina esterasa, esteroil esterasa, hidroxicinamoil esterasa, ácido acetilsalicílico esterasa y polineuridina esterasa.

35 **Acilasas**

En algunas realizaciones de la invención también pueden emplearse acilasas. Los ejemplos de acilasas de uso en la presente invención incluyen aminoacilasa I, L-amino acilasa, penicilin acilasa, acetil-CoA acilasa, acil-lisina desacilasa, aculeacín A acilasa, succinil-CoA acilasa y acetil-aspártico desaminasa.

Acetiltransferasas

40 En otra realización de la invención, la transferencia de acilo se realiza mediante una acetiltransferasa. El uso de acetiltransferasas en la acilación de sacáridos se ha descrito anteriormente. Se ha observado que la O-acetilación en la posición 9 del ácido siálico se produce a partir del producto de diversos genes en el sistema de células COS (Shi y col., Glycobiology, **8(2)**, 199-205 (1998)). Se sabe que la maltosa O-acetiltransferasa (MAT) de *Escherichia coli* cataliza la transferencia del grupo acetilo a las posiciones C6 de glucosa y maltosa. (Leggio y col., Biochemistry, **42**, 5225-5235 (2003)). Este mismo grupo también utilizó galactósido acetiltransferasa (GAT) para catalizar la transferencia del grupo acetilo a unidades de galactosilo. Otras acetiltransferasas para su uso en la presente invención incluyen espermidín acetiltransferasa, diamin *N*-acetiltransferasa y sialato O-acetiltransferasa.

Transferencia de azúcares

50 Además de las enzimas indicadas anteriormente en el contexto de la formación del conjugado unido a acilo, el patrón de glucosilación del conjugado y los sustratos de partida (por ejemplo, péptidos, lípidos) pueden elaborarse, recortarse o de otro modo modificarse por procedimientos que utilizan otras enzimas. Los procedimientos de remodelación de péptidos y lípidos usando enzimas que transfieren un donador de azúcar a un aceptor se analizan con detalle en DeFrees, WO 03/031464 A2, publicado el 17 de abril de 2003. Más adelante se expone un breve resumen de enzimas seleccionadas de uso en el presente procedimiento.

55 **Glucosiltransferasas**

Las glucosiltransferasas catalizan la adición de azúcares activados (azúcares NDP donadores), de una manera gradual, a una proteína, glucopéptido, lípido o glucolípido o al extremo no reductor de un oligosacárido en crecimiento. Los glucopéptidos unidos a N se sintetizan mediante una transferasa y un donador de oligosacárido unido a lípido Dol-PP-NAG₂Glc₃Man₉ en una transferencia en bloque seguido por recortes del núcleo. En este caso la naturaleza del sacárido "núcleo" es algo diferente de la de las uniones posteriores. En la técnica se conocen una gran cantidad de glucosiltransferasas.

Para la síntesis enzimática de sacáridos que implica reacciones de glucosiltransferasa, la glucosiltransferasa se puede clonar, o aislar, de cualquier fuente. Se conocen muchas glucosiltransferasas clonadas, así como sus secuencias de polinucleótidos. Véase, por ejemplo, "The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases" (http://www.vei.co.uk/TGN/qt_guide.htm). Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la glucosiltransferasa que codifican las glucosiltransferasas a partir de las cuales se pueden deducir las secuencias de aminoácidos se encuentran también en diversas bases de datos públicamente disponibles, entre las que se incluyen GenBank, Swiss-Prot, EMBL y otras.

Las glucosiltransferasas que se pueden emplear en los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a, galactosiltransferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, *N*-acetilgalactosaminiltransferasas, *N*-acetilglucosaminiltransferasas, glucuroniltransferasas, sialiltransferasas, manosiltransferasas, transferasas de ácido glucurónico, transferasas de ácido galacturónico, y oligosacariiltransferasas. Las glucosiltransferasas adecuadas incluyen las que se obtienen de eucariotas, así como de procariotas.

Fucosiltransferasas

En algunas realizaciones, una glucosiltransferasa usada en el procedimiento de la invención es una fucosiltransferasa. Las fucosiltransferasas son conocidas por los expertos en la técnica. Las fucosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen enzimas, que transfieren L-fucosa de GDP fucosa a una posición hidroxil de un azúcar aceptor. Las fucosiltransferasas que transfieren azúcares no nucleotídicos a un aceptor también son de uso en la presente invención.

En algunas realizaciones, el azúcar aceptor es, por ejemplo, GlcNAc en un grupo Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β - en un glucósido oligosacárido. Las fucosiltransferasas adecuadas para esta reacción incluyen Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β 1- α (1 \rightarrow 3,4)fucosiltransferasa (FTIII E.C. No. 2.4.1.65) que se caracterizó por primera vez de leche humana (véase, Palcic, y col., Carbohydrate Res. **190**:1-11 (1989); Prieels, y col., J. Biol. Chem. **256**: 10456-10463 (1981); y Nunez, y col., Can. J. Chem. **59**: 2086-2095 (1981)) y las Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc β - α fucosiltransferasas (FTIV, FTV, FTVI) que se descubrieron en suero humano. También se ha caracterizado FTVII (E.C. N.º 2.4.1.65), una sialil α (2 \rightarrow 3)Gal β ((1 \rightarrow 3)GlcNAc β fucosiltransferasa. También se ha caracterizado una forma recombinante de Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β - α (1 \rightarrow 3,4)fucosiltransferasa (véase, Dumas, y col., Bioorg. Med. Letters **1**: 425-428 (1991) y Kukowska-Latallo, y col., Genes and Development **4**: 1288-1303 (1990)). Otras fucosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, α 1,2 fucosiltransferasa (E.C. N.º 2.4.1.69). La fucosilación enzimática puede realizarse mediante los procedimientos descritos en Mollicone, y col., Eur. J. Biochem. **191**: 169-176 (1990) o en la Patente de Estados Unidos n.º 5.374.655. Las células que se usan para producir una fucosiltransferasa también incluirán un sistema enzimático para sintetizar GDP-fucosa.

Galactosiltransferasas

En otro grupo de realizaciones, la glucosiltransferasa es una galactosiltransferasa. Las galactosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen α (1,3) galactosiltransferasas (E.C. n.º 2.4.1.151, véase, p. ej., Dabkowski y col., Transplant Proc. **25**: 2921 (1993) y Yamamoto y col. Nature **345**: 229-233 (1990), bovinas (GenBank j04989, Joziase y col., J. Biol. Chem. **264**: 14290-14297 (1989)), murinas (GenBank m26925; Larsen y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA **86**: 8227-8231 (1989)), porcinas (GenBank L36152; Strahan y col., Immunogenetics **41**: 101-105 (1995)). Otra α 1,3 galactosiltransferasa adecuada es la que está implicada en la síntesis del antígeno del grupo sanguíneo B (EC 2.4.1.37, Yamamoto y col., J. Biol. Chem. **265**: 1146-1151 (1990) (human)). Incluso una galactosiltransferasa más, a modo de ejemplo, es la Gal-T1 núcleo.

También son adecuadas para su uso en los procedimientos de la invención las β (1,4) galactosiltransferasas, que incluyen, por ejemplo, EC 2.4.1.90 (LacNAc sintetasa) y EC 2.4.1.22 (lactosa sintetasa) (bovina (D'Agostaro y col., Eur. J. Biochem. **183**: 211-217 (1989)), humana (Masri y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. **157**: 657-663 (1988)), murina (Nakazawa y col., J. Biochem. **104**: 165-168 (1988)) así como E.C. 2.4.1.38 y la ceramida galactosiltransferasa (EC 2.4.1.45, Stahl y col., J. Neurosci. Res. **38**: 234-242 (1994)). Otras galactosiltransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo, α 1,2 galactosiltransferasas (p. ej., de *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell y col., Mol. Biol. Cell **5**: 519-528 (1994)).

Sialiltransferasas

Las sialiltransferasas son otro tipo de glucosiltransferasa que es útil en las células recombinantes y en las mezclas de reacción de la invención. Las células que producen sialiltransferasas recombinantes también producirán ácido CMP-siálico, que es un ácido siálico donador para sialiltransferasas. Los ejemplos de sialiltransferasas que son adecuados para su uso en la presente invención incluyen ST3Gal III (por ejemplo, una ST3Gal III de rata o de ser

- humano), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II y ST6GalNAc III (la nomenclatura de las sialiltransferasas utilizadas en la presente memoria es como la que se describe en Tsuji y col., *Glycobiology* 6: v-xiv (1996)). Una $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa a modo de ejemplo, denominada $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa (EC 2.4.99.6), transfiere ácido siálico al extremo Gal no reductor de un disacárido o glucósido Gal β 1 \rightarrow 3Glc. Véanse, Van den Eijnden y col., *J. Biol. Chem.* **256**: 3159 (1981), Weinstein y col., *J. Biol. Chem.* **257**: 13845 (1982) y Wen y col., *J. Biol. Chem.* **267**: 21011 (1992). Otra $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa (EC 2.4.99.4) a modo de ejemplo transfiere ácido siálico al extremo Gal no reductor del disacárido o glucósido. Véanse, Rearick y col., *J. Biol. Chem.* **254**: 4444 (1979) y Gillespie y col., *J. Biol. Chem.* **267**: 21004 (1992). Otra enzima adicional a modo de ejemplo incluye Gal- β -1,4-GlcNAc α -2,6 sialiltransferasa (Véase, Kurosawa y col. *Eur. J. Biochem.* **219**: 375-381 (1994)).
- 10 Preferiblemente, para la glucosilación de hidratos de carbono de los glucopéptidos, la sialiltransferasa podrá transferir ácido siálico a la secuencia Gal β 1,4GlcNAc-, la penúltima secuencia más común subyacente al ácido siálico terminal en las estructuras de hidratos de carbono completamente sialiladas (véase, la Tabla 3).

Tabla 3: sialiltransferasas que usan la secuencia Gal β 1, 4GlcNAc como un sustrato aceptor

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia(s) formada(s)	Ref.
ST6Gal I	Mamífero	NeuAca2,6Gal β 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mamífero	NeuAca2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAca2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	Mamífero	NeuAca2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAca2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal II	Mamífero	NeuAca2,6Gal β 1,4GlcNAc-	
ST6Gal II	<i>Photobacterium</i>	NeuAca2,6Gal β 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitides</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NeuAca2,3Gal β 1,4GlcNAc-	3

- 15 1) Goochee y col., *Bio/Technology* **9**: 1347-1355 (1991)
2) Yamamoto y col., *J. Biochem.* **120**: 104-110 (1996)
3) Gilbert y col., *J. Biol. Chem.* **271**: 28271-28276 (1996)

Un ejemplo de una sialiltransferasa que es útil en los procedimientos reivindicados es ST3Gal III, que también se denomina $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa (EC 2.4.99.6). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido siálico al Gal de un glucósido de Gal β 1,3GlcNAc o de Gal β 1,4GlcNAc (véase, p. ej., Wen y col., *J. Biol. Chem.* **267**: 21011 (1992); Van den Eijnden y col., *J. Biol. Chem.* **256**: 3159 (1991)) y es responsable de la sialilación de oligosacáridos unidos a asparagina en los glucopéptidos. El ácido siálico se une a Gal con la formación de un enlace α entre los dos sacáridos. La unión (enlace) entre los sacáridos se realiza entre la posición 2 de NeuAc y la posición 3 de Gal. Esta enzima particular se puede aislar del hígado de rata (Weinstein y col., *J. Biol. Chem.* **257**: 13845 (1982)); se conocen las secuencias de ADNc humano (Sasaki y col. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 22782-22787; Kitagawa y Paulson (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 1394-1401) y genómico (Kitagawa y col. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 931-938), lo que facilita la producción de esta enzima mediante expresión recombinante. En una realización preferida, los procedimientos de sialilación reivindicados usan una ST3Gal III de rata.

Otras sialiltransferasas a modo de ejemplo de uso en la presente invención incluyen aquellas aisladas de *Campylobacter jejuni*, incluyendo la $\alpha(2,3)$. Véase, por ejemplo, el documento WO99/49051.

Otras sialiltransferasas distintas de las indicadas en la Tabla 3, también son útiles en un proceso a gran escala, rentable y eficaz para la sialilación de glucopéptidos importantes desde el punto de vista comercial. Como un ensayo sencillo para encontrar la utilidad de estas otras enzimas, diversas cantidades de cada enzima (1-100 mU/mg de proteína) se hacen reaccionar con asialo- α_1 AGP (a 1-10 mg/ml) para comparar la capacidad de la sialiltransferasa de interés para sialilar glucopéptidos con respecto a ST6Gal I, ST3Gal III de bovino o a ambas sialiltransferasas. De manera alternativa, para esta evaluación se pueden usar otros glucopéptidos u oligosacáridos unidos a N liberados enzimáticamente de la estructura peptídica en lugar de asialo- α_1 AGP. Las sialiltransferasas con la capacidad de sialilar oligosacáridos de glucopéptidos unidos a N más eficazmente que ST6Gal I son útiles en un procedimiento práctico a gran escala para la sialización de péptidos.

La FIGURA 2 proporciona un listado de ejemplos de sialiltransferasas de uso en la presente invención.

GalNAc transferasas

Las *N*-acetilgalactosaminiltransferasas son de uso en la práctica de la presente invención, particularmente para unir un residuo de GalNAc con un aminoácido del sitio de glucosilación ligado a O del péptido. Las *N*-acetilgalactosaminiltransferasas adecuadas incluyen, pero sin limitación, $\alpha(1,3)$ *N*-acetilgalactosaminiltransferasa,

β (1,4) *N*-acetilgalactosaminiltransferasas (Nagata *y col.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 12082-12089 (1992) y Smith *y col.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 15162 (1994)) y la *N*-acetilgalactosaminiltransferasa polipeptídica (Homa *y col.*, *J. Biol. Chem.* **268**: 12609 (1993)).

5 La producción de proteínas, tales como la enzima GalNAc T_{I-XX} a partir de genes clonados mediante modificación por ingeniería genética es muy conocida. Véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos n.º 4.761.371. Otro procedimiento implica la recogida de suficientes muestras y después determinar la secuencia de aminoácidos de la enzima mediante secuenciación del extremo N. A continuación, esta información se usa para aislar un clon de ADNc que codifica una transferasa de longitud completa (unida a membrana) que, tras su expresión en la línea Sf9 de células de insecto, da como resultado la síntesis de una enzima completamente activa. Después, la especificidad 10 aceptora de la enzima se determina usando un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean sitios de glucosilación conocidos en 16 proteínas diferentes, seguido de estudios de glucosilación *in vitro* de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que determinados restos de aminoácidos están representados en exceso en segmentos peptídicos glucosilados y que los restos situados en posiciones específicas que rodean los restos de serina y treonina glucosilados pueden tener una influencia más marcada sobre la eficacia aceptora en comparación 15 con otros restos de aminoácidos.

Glucosiltransferasas unidas a células

En otra realización, las enzimas utilizadas en el procedimiento de la invención son glucosiltransferasas unidas a células. Aunque se conocen muchas glucosiltransferasas solubles (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.032.519), las glucosiltransferasas se encuentran por lo general en una forma unida a membrana cuando 20 se asocian con células. Se considera que muchas de las enzimas unidas a membrana estudiadas hasta el momento son proteínas intrínsecas, es decir, no se liberan de las membranas por ultrasonido y requieren detergentes para su solubilización. Se han identificado glucosiltransferasas superficiales sobre las superficies de células de vertebrados e invertebrados, y también se ha reconocido que estas transferasas superficiales mantienen la actividad catalítica en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la función más reconocida de las glucosiltransferasas superficiales celulares es para el reconocimiento intercelular (Roth, MOLECULAR APPROACHES to SUPRACELLULAR PHENOMENA, 25 1990).

Se han desarrollado procedimientos para alterar las glucosiltransferasas expresadas por células. Por ejemplo, Larsen *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8227-8231 (1989), notificaron una estrategia genética para aislar secuencias de ADNc clonadas que determinan la expresión de estructuras de oligosacáridos superficiales celulares y sus glucosiltransferasas análogas. Una biblioteca de ADNc generada a partir de ARNm aislado de una línea de células de murino que se sabía que expresaba UDP-galactosa: β -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida α -1,3- 30 galactosiltransferasa se transfeció en células COS-1. Después, las células transfectadas se cultivaron y ensayó su actividad α 1-3 galactosiltransferasa.

Francisco *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2713-2717 (1992), describen un procedimiento de anclaje de la β -lactamasa en la superficie externa de *Escherichia coli*. Una fusión tripartita que consiste en (i) una secuencia señal de una proteína de la membrana externa, (ii) una sección extensora de la membrana de una proteína de la membrana externa y (iii) se produce una secuencia de la β -lactamasa madura completa dando como resultado una molécula de β -lactamasa unida a una superficie activa. Sin embargo, el procedimiento de Francisco se limita solo a sistemas de células procariontas y, como reconocen los autores, requiere la fusión tripartita completa para un funcionamiento adecuado. 40

Sulfottransferasas

La invención también proporciona procedimientos para producir péptidos que incluyen moléculas sulfatadas, incluyendo, por ejemplo, polisacáridos sulfatados, tales como, heparina, sulfato de heparán, carragenano y compuestos relacionados. Las sulfottransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo, condroitin-6-sulfottransferasa 45 (ADNc de pollo descrito por Fukuta *y col.*, *J. Biol. Chem.* **270**: 18575-18580 (1995); n.º de registro del GenBank D49915), glucosaminoglucono *N*-acetilglucosamina *N*-desacetilasa/*N*-sulfottransferasa 1 (Dixon *y col.*, *Genomics* **26**: 239-241 (1995); UL18918), y glucosaminoglucono *N*-acetilglucosamina *N*-desacetilasa/*N*-sulfottransferasa 2 (ADNc murino descrito en Orellana *y col.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 2270-2276 (1994) y Eriksson *y col.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 10438-10443 (1994); ADNc humano descrito en el n.º de registro del GenBank U2304).

Glucosidasas

La invención también incluye el uso de glucosidasas de tipo silvestre y mutante. Se ha demostrado que las enzimas β -galactosidasa mutantes catalizan la formación de disacáridos a través del acoplamiento de un fluoruro de α -glucosilo con una molécula aceptora de galactosilo. (Withers, Patente de Estados Unidos n.º 6.284.494; expedida el 4 de septiembre del 2001). Otras glucosidasas de uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, β -glucosidasas, β -galactosidasas, β -manosidasas, β -acetil glucosaminidasas, β -*N*-acetil galactosaminidasas, β -xilosidasas, β -fucosidasas, celulasas, xilanasas, galactanasas, mananasas, hemicelulasas, amilasas, glucoamilasas, α -glucosidasas, α -galactosidasas, α -manosidasas, α -*N*-acetil glucosaminidasas, α -*N*-acetil galactosaminidasas, α -xilosidasas, α -fucosidasas y neuraminidasas/sialidasas. 55

Enzimas inmovilizadas

La presente invención también proporciona el uso de enzimas que están inmovilizadas en un soporte sólido y/o soluble. En una realización a modo de ejemplo, se proporciona una glucosiltransferasa que se conjuga con un PEG mediante un enlazador de glucosilo intacto según los procedimientos de la invención. El conjugado PEG-enlazador-enzima está opcionalmente unido a un soporte sólido. El uso de enzimas en un soporte sólido en los procedimientos de la invención simplifica el desarrollo de la mezcla de reacción y de purificación del producto de reacción, y también permite la fácil recuperación de la enzima. El conjugado de glucosiltransferasa se utiliza en los procedimientos de la invención. Serán obvias para los expertos en la técnica otras combinaciones de enzimas y soportes.

Glucosilación por procedimientos recombinantes

Los conjugados peptídicos FGF también pueden producirse intracelularmente por medios recombinantes. Una secuencia de polinucleótidos que codifica un FGF, que comprende al menos un sitio de glucosilación unido a N o unido a O recién introducido, puede transferirse en una línea de célula hospedadora adecuada, p. ej., una línea de célula eucariota derivada de levadura, insecto o de origen mamífero. La maquinaria de glucosilación de la célula hospedadora glucosila el Factor de Crecimiento de Fibroblastos producido de manera recombinante, a partir de dicha línea celular.

Purificación de conjugados peptídicos FGF

El conjugado peptídico FGF producido por los procesos anteriores se purifica preferiblemente antes de su uso. Pueden usarse técnicas bien conocidas, convencionales, tales como cromatografía en capa fina o gruesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico o filtración con membrana. Para la recuperación se prefiere usar filtración con membrana, más preferiblemente usar una membrana osmótica inversa, o una o más técnicas de cromatografía en columna, como se comenta en lo sucesivo en la presente memoria y en la bibliografía citada en la misma.

Si el conjugado peptídico FGF se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos del material particulado, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína se puede concentrar con un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, seguido por la separación de la variante polipeptídica de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas de cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento en columnas de intercambio iónico (por ejemplo, en dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos de carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía en Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lenticil lectin-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, Fenil Toyopearl, SP-Sepharose o proteína A Sepharose, cromatografía en SDS-PAGE, cromatografía en gel de sílice, cromatografía de exclusión por tamaño, HPLC de fase inversa (por ejemplo gel de sílice con grupos alifáticos agregados), filtración en gel utilizando, por ejemplo, un tamiz molecular de Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en columnas que se unen selectivamente al polipéptido, y precipitación con etanol o sulfato de amonio.

Un conjugado peptídico FGF producido en cultivo se aísla normalmente mediante extracción inicial de células, lisado celular, medios de cultivo, etc., seguido de una o más concentraciones, desalinización, intercambio iónico en disolución acuosa o etapas de cromatografía de exclusión por tamaño. Adicionalmente, la glucoproteína puede modificarse mediante cromatografía de afinidad. Finalmente, puede emplearse HPLC para las etapas finales de la purificación.

Se puede incluir un inhibidor de proteasa, p. ej., fluoruro de metilsulfonilo (PMSF) en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes accidentales.

En algunos casos, los sobrenadantes de los sistemas que producen los conjugados peptídicos FGF de la invención se concentran primero utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender un ligando para el péptido, una lectina o una molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. Como alternativa, puede emplearse resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tenga grupos DEAE colgantes. Las matrices adecuadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos habitualmente empleados en la purificación de proteínas. Además, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos de sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren particularmente grupos de sulfopropilo.

Finalmente se pueden emplear una o más etapas de RP-HPLC que emplean medios de RP-HPLC hidrófobos, p.ej., gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes para purificar adicionalmente un conjugado peptídico FGF. También se pueden emplear alguna o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una glucoproteína.

El conjugado peptídico FGF de la invención resultante de una fermentación a gran escala se puede purificar

mediante procedimientos análogos a los descritos por Urdal y col., *J. Chromatog.* **296**: 171 (1984). Esta referencia describe dos etapas secuenciales de RP-HPLC para la purificación de IL-2 humana recombinante en una columna de HPLC preparativa. Como alternativa, se pueden utilizar técnicas tales como cromatografía de afinidad para purificar la glucoproteína.

- 5 Después de la producción y, preferiblemente, la purificación de un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante glucosilado, las funciones biológicas de la proteína se ensayan usando diversos procedimientos conocidos en la técnica. Los ensayos funcionales se basan en diversas características del Factor de Crecimiento de Fibroblastos.

Composiciones farmacéuticas y administración

10 Los conjugados peptídicos FGF que tienen los determinantes oligosacarídicos deseados, descritos anteriormente, pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones relacionadas con el déficit de la hormona del crecimiento. Las afecciones relacionadas con el crecimiento que pueden tratarse con los conjugados peptídicos FGF de la presente invención incluyen: enanismo, baja estatura en niños y adultos, caquexia/desgaste muscular, atrofia muscular general, y anomalías del cromosoma sexual (por ejemplo, Síndrome de Turner). Otras afecciones que pueden tratarse usando los conjugados peptídicos FGF de la presente invención incluyen: síndrome de intestino grueso, lipodistrofia, osteoporosis, uremia, quemaduras, infertilidad femenina, regeneración ósea, diabetes general, diabetes de tipo II, osteoartritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) e insomnio. Los conjugados peptídicos FGF de la invención también pueden usarse para promover diversos procesos de curación, por ejemplo, regeneración de tejidos general, regeneración de huesos y cicatrización de heridas, así como un adjunto de vacuna. Por tanto, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un conjugado peptídico FGF, que se produce según los procedimientos descritos anteriormente.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para su uso en diversos sistemas de liberación de fármacos. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17^a ed. (1985). Para una breve revisión acerca de los procedimientos de liberación de fármacos, véase, Langer, *Science* **249**: 1527-1533 (1990).

30 Las composiciones farmacéuticas están destinadas para administración parenteral, intranasal, tópica, oral o local, tal como mediante inyección subcutánea, por inhalación mediante aerosol o adsorción transdérmica, para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Habitualmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea o intravenosa. Por tanto, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden el conjugado peptídico FGF disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferiblemente en un vehículo acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones también pueden contener detergentes tales como Tween 20 y Tween 80; estabilizantes tales como manitol, sorbitol, sacarosa y trehalosa; y conservantes tales como EDTA y m-cresol. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes ajustadores de pH y de tamponamiento, agentes ajustadores de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

35 Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar de forma estéril. Para el uso de las soluciones acuosas resultantes, estas pueden envasarse como tales, o pueden liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril, antes de su administración. El pH de las preparaciones estará típicamente entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 a 9 y lo más preferiblemente entre 7 y 8.

40 Las composiciones que contienen los conjugados peptídicos FGF pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad o una afección que está relacionada con el déficit de la hormona del crecimiento, en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para cumplir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad o afección y del peso y del estado general del paciente, aunque generalmente varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2.000 mg de conjugados peptídicos FGF por día para un paciente de 70 kg con dosificaciones de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg de los compuestos por día siendo esta la dosis más habitualmente utilizada.

45 En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen el conjugado peptídico FGF de la invención se administran a un paciente susceptible a, o de otra manera que está en riesgo de, una enfermedad particular. Dicha cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades exactas de nuevo dependen del estado de salud y del peso del paciente, pero generalmente varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1.000 mg para un paciente de 70 kilogramos, más habitualmente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg por 70 kg de peso corporal.

55 Las administraciones sencillas o múltiples de las composiciones pueden realizarse seleccionando el médico tratante los niveles de dosis y patrones. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad

cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), y donde al menos uno es treonina (T) o serina (S) y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los símbolos a y b representan independientemente 0 o 1. Para aclarar, las secuencias designadas como SEQ ID NO: 12-14, 338-344 contienen inserciones de aminoácidos entre P³ y L⁴ de la secuencia de FGF-20 nativa. Los ejemplos preferidos incluyen:

5

MAPTP³LAEV; SEQ ID NO: 9
 MVTP³LAEV; SEQ ID NO: 10
 MAP³TTEV; SEQ ID NO: 11
 MAP³TQGAMPL⁴AEV; SEQ ID NO: 12
 MAP³TSSL⁴AEV; SEQ ID NO: 13
 MAP³TALPL⁴AEV; SEQ ID NO: 14
 MAP³TQAPL⁴AEV; SEQ ID NO: 338
 MAP³TEIPL⁴AEV; SEQ ID NO: 339
 MAP³TINTPL⁴AEV; SEQ ID NO: 340
 MAP³TINTL⁴AEV; SEQ ID NO: 341
 MAP³TTVSL⁴AEV; SEQ ID NO: 342
 MAP³TQEV⁴AEV; SEQ ID NO: 343
 MAP³TQAVL⁴AEV; SEQ ID NO: 344

2. Región 2

10 En estos mutantes, la QVGSHFLLP²⁸P²⁹A³⁰GERPPLGERRS, SEQ ID NO: 3, de tipo silvestre, se subdivide en tres regiones: Región 2(a) VGSHFLLP²⁸P²⁹A³⁰GERPP, SEQ ID NO: 15; Región 2(b) P²⁸P²⁹AGERPP, SEQ ID NO: 16; y Región 2(c) P³⁴P³⁵PLLGERRS, SEQ ID NO: 17. A continuación, las mutaciones en cada región se consideran independientemente.

15 Región 2(a): en estos mutantes la VGSHFLLP²⁸P²⁹A³⁰GERPP (SEQ ID NO: 15) de tipo silvestre se reemplaza con 1234XYZ P²⁸P²⁹A³⁰ donde 1, 2, 3, 4, X, Y, Z, se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), donde al menos uno es treonina (T) o serina (S) y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los símbolos a y b representan independientemente 0 o 1. Las mutaciones preferidas incluyen:

TET P²⁸P²⁹A³⁰GERPP; SEQ ID NO: 18
 GTET P²⁸P²⁹A³⁰GERPP; SEQ ID NO: 19
 VGTET P²⁸P²⁹A³⁰GERPP; SEQ ID NO: 20
 TGT P²⁸P²⁹AEERPP; SEQ ID NO: 21
 TAT P²⁸P²⁹AEERPP; SEQ ID NO: 22

20 Región 2(b): en estos mutantes la P²⁸P²⁹A³⁰GERPP (SEQ ID NO: 16) de tipo silvestre se reemplaza con P²⁸P²⁹1234(S)_aPP donde 1, 2, 3, 4, X, Y, Z son como se describe para la Región 2(a). Las mutaciones preferidas incluyen:

P²⁸P²⁹TGEAPP; SEQ ID NO: 23
 P²⁸P²⁹TGEVPP; SEQ ID NO: 24
 P²⁸P²⁹TQGAPP; SEQ ID NO: 25
 P²⁸P²⁹ATVAPP; SEQ ID NO: 26
 P²⁸P²⁹ATILPP; SEQ ID NO: 27
 P²⁸P²⁹AGTAPP; SEQ ID NO: 28
 P²⁸P²⁹TQGAMPP; SEQ ID NO: 29
 P²⁸P²⁹GSTAPP; SEQ ID NO: 30
 P²⁸P²⁹AGTSPP; SEQ ID NO: 31
 P²⁸P²⁹AGETPP; SEQ ID NO: 32

P²⁸P²⁹ATETPP; SEQ ID NO: 33
 P²⁸P²⁹GTETPP; SEQ ID NO: 34
 P²⁸P²⁹TGERPP; SEQ ID NO: 35
 P²⁸P²⁹TINTPP; SEQ ID NO: 345
 P²⁸P²⁹TTVSPP; SEQ ID NO: 346
 P²⁸P²⁹TQALPP; SEQ ID NO: 347

5 Región 2(c): en estos mutantes la P³⁴P³⁵PLLGERRS (SEQ ID NO: 17) de tipo silvestre se reemplaza con P³⁴P³⁵123456 donde 1, 2, 3, 4, 5, 6 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), y donde al menos uno es treonina (T) o serina (S) y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación ligado a O. Las mutaciones preferidas incluyen:

P³⁴P³⁵TQGAMP; SEQ ID NO: 36
 P³⁴P³⁵TQGAMRS; SEQ ID NO: 37
 P³⁴P³⁵TQGAMAS; SEQ ID NO: 38
 P³⁴P³⁵TQGAMFS; SEQ ID NO: 39
 P³⁴P³⁵TSSSTRS; SEQ ID NO: 40
 P³⁴P³⁵TSSSTKS; SEQ ID NO: 41
 P³⁴P³⁵TGERRS; SEQ ID NO: 42
 P³⁴P³⁵TIGVRRS; SEQ ID NO: 43
 P³⁴P³⁵TTGEARS; SEQ ID NO: 44
 P³⁴P³⁵TAGERRS; SEQ ID NO: 45
 P³⁴P³⁵TINTRRS; SEQ ID NO: 348
 P³⁴P³⁵TTVSRRS; SEQ ID NO: 349

3. Región 3

10 En estos mutantes, la secuencia de aminoácidos que rodea a P⁵², AAERSARGGP⁵²GAAQLAHL; SEQ ID NO: 4, se subdivide en dos regiones; Región 3(a) RSARGGP⁵²; SEQ ID NO: 46 y Región 3(b) P⁵²GAAQLA, SEQ ID NO: 47. A continuación, las mutaciones en cada región se consideran individualmente.

15 Región 3(a): en estos mutantes la RSARGGP⁵² (SEQ ID NO: 46) de tipo silvestre se reemplaza con 123456P⁵² donde 1, 2, 3, 4, 5, 6 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), donde al menos uno es treonina (T) o serina (S), y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los ejemplos preferidos incluyen:

RSATETP⁵²; SEQ ID NO: 48
 RSGTETP⁵²; SEQ ID NO: 49
 RSGTETP⁵²; SEQ ID NO: 50
 RVGTETP⁵²; SEQ ID NO: 51
 GVGTEP⁵²; SEQ ID NO: 52
 GSATETP⁵²; SEQ ID NO: 53
 GVGVTETP⁵²; SEQ ID NO: 54
 GVTETP⁵²; SEQ ID NO: 55
 QTETP⁵²; SEQ ID NO: 56
 GVTSAP⁵²; SEQ ID NO: 57
 SVVTP⁵²; SEQ ID NO: 58

Región 3(b): en estos mutantes la P⁵²GAAQLA (SEQ ID NO: 47) de tipo silvestre se reemplaza con P⁵²123456 donde 1, 2, 3, 4, 5, 6 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico

(E), donde al menos uno es treonina (T) o serina (S), y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los ejemplos preferidos incluyen:

P⁵²TGAQLA; SEQ ID NO: 59
 P⁵²TQGAMP; SEQ ID NO: 60
 P⁵²TQGAMA; SEQ ID NO: 61
 P⁵²TTAQLA; SEQ ID NO: 62
 P⁵²GATQLA; SEQ ID NO: 63
 P⁵²TSSSTA; SEQ ID NO: 64
 P⁵²TSSSLA; SEQ ID NO: 65
 P⁵²TINTLA; SEQ ID NO: 350
 P⁵²TTVSLA; SEQ ID NO: 351
 P⁵²TQAQLA; SEQ ID NO: 352

4. Región 4

- 5 En estos mutantes, la TGFHLQIL P⁸¹DGSVQGT; SEQ ID NO: 5, de tipo silvestre, se subdivide en tres regiones; Región 4(a) HLQILP⁸¹; SEQ ID NO: 66; Región 4(b) P⁸¹DGSVQGT; SEQ ID NO: 67; y Región 4(c) P⁸¹NGS; SEQ ID NO: 68. A continuación, las mutaciones en cada región se consideran individualmente.

10 Región 4(a): en estos mutantes la HLQILP⁸¹ (SEQ ID NO: 66) de tipo silvestre se reemplaza con 12345 P⁸¹ donde 1, 2, 3, 4, 5 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), donde al menos uno es treonina (T) o serina (S); y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los ejemplos preferidos incluyen:

QTELP⁸¹; SEQ ID NO: 69
 LIVTP⁸¹; SEQ ID NO: 70
 LTELP⁸¹; SEQ ID NO: 71
 LTELP⁸¹; SEQ ID NO: 72
 GVTSAP⁸¹; SEQ ID NO: 73
 HLTETP⁸¹; SEQ ID NO: 74
 VLTETP⁸¹; SEQ ID NO: 75
 VGTETP⁸¹; SEQ ID NO: 76
 VGVGTETP⁸¹; SEQ ID NO: 77
 VTSAP⁸¹; SEQ ID NO: 78
 VSTP⁸¹; SEQ ID NO: 79
 EATP⁸¹; SEQ ID NO: 80

15 Región 4(b): en estos mutantes la P⁸¹DGSVQGT (SEQ ID NO: 67) de tipo silvestre se reemplaza con P⁸¹12345GT donde 1, 2, 3, 4 y 5 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), donde al menos uno es treonina (T) o serina (S), y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los ejemplos preferidos incluyen:

P⁸¹TGSVGT; SEQ ID NO: 81
 P⁸¹TQGVQGT; SEQ ID NO: 82
 P⁸¹TGSVPGT; SEQ ID NO: 83
 P⁸¹TQGAMPGT; SEQ ID NO: 84
 P⁸¹TTSVQGT; SEQ ID NO: 85
 P⁸¹TTAVQGT; SEQ ID NO: 86
 P⁸¹TINTQGT; SEQ ID NO: 353
 P⁸¹TTVSQGT; SEQ ID NO: 354

Región 4(c): en estos mutantes la P⁸¹DGS (SEQ ID NO: 68) de tipo silvestre se muta para crear un sitio de glucosilación unido a N. Los ejemplos preferidos incluyen:

ILP⁸¹NGSVH; SEQ ID NO: 87
 IFP⁸¹NGSV; SEQ ID NO: 88
 P⁸¹NGT; SEQ ID NO: 89
 LP⁸¹NGTVH; SEQ ID NO: 90
 P⁸¹NGTV; SEQ ID NO: 91
 ILP⁸¹NGT; SEQ ID NO: 92
 QILP⁸¹NGT; SEQ ID NO: 93
 QILP⁸¹NGTVH; SEQ ID NO: 94

5. Región 5

5 En estos mutantes la LN KDGTP¹⁷⁵RDGAR SKRH, SEQ ID NO: 6, de tipo silvestre, se reemplaza con 12345 P¹⁷⁵67891011 donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), donde al menos uno es treonina (T) o serina (S), y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los ejemplos preferidos incluyen:

LNVTEP¹⁷⁵RDGARSKRH; SEQ ID NO: 95
 LNVTEP¹⁷⁵DDGARSKRH; SEQ ID NO: 96
 LNVTEP¹⁷⁵LDGARSKRH; SEQ ID NO: 97
 LNAITTP¹⁷⁵RDGARSKRH; SEQ ID NO: 98
 LNAITTP¹⁷⁵LDGARSKRH; SEQ ID NO: 99
 LNQEATP¹⁷⁵LDGARSKRH; SEQ ID NO: 100
 LNQTELP¹⁷⁵LDGARSKRH; SEQ ID NO: 101
 LNQTELP¹⁷⁵ADGARSKRH; SEQ ID NO: 102
 LNKDGTP¹⁷⁵TDGARSKRH; SEQ ID NO: 103
 LNKDGTP¹⁷⁵TSGARSKRH; SEQ ID NO: 104
 LNKDGTP¹⁷⁵IDGAASKRH; SEQ ID NO: 105
 LNKDGTP¹⁷⁵TSGAASKRH; SEQ ID NO: 106
 LNKDGTP¹⁷⁵TQGAMPKRH; SEQ ID NO: 107
 LNKDGTP¹⁷⁵TQGAMSKRH; SEQ ID NO: 108
 LNKDGTP¹⁷⁵TTTARSKRH; SEQ ID NO: 109
 LN KDGTP¹⁷⁵TINTRSKRH; SEQ ID NO: 355
 LN KDGTP¹⁷⁵TINTSSKRH; SEQ ID NO: 356
 LN KDGTP¹⁷⁵TTVSRSKRH; SEQ ID NO: 357
 LN KDGTP¹⁷⁵TTVSASKRH; SEQ ID NO: 358

10

6. Región 6

En estos mutantes, la secuencia de tipo silvestre, FTHFL P¹⁹²RPVD P¹⁹⁷ERVP²⁰¹ELYKDLL; SEQ ID NO: 7, se subdivide en dos regiones; Región 6(a) LP¹⁹²RPVD P¹⁹⁷ERV P²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 110 y Región 6(b) P¹⁹⁷ERVP²⁰¹ELYKD, SEQ ID NO: 111. A continuación, las mutaciones en cada región se consideran individualmente.

15

Región 6(a): en estos mutantes la LP¹⁹²RPVD P¹⁹⁷ERVP²⁰¹ELYKD (SEQ ID NO: 110) de tipo silvestre, se reemplaza con P¹⁹²IP23 P¹⁹⁷ donde 1, 2, 3 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), donde al menos uno es treonina (T) o serina (S), y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los ejemplos preferidos incluyen:

20

LP¹⁹²APTD P¹⁹⁷ERV²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 112
 LP¹⁹²NPTA P¹⁹⁷ERV²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 113
 LP¹⁹²RPTA P¹⁹⁷ERV²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 114
 LP¹⁹²APTQ P¹⁹⁷ERV²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 115
 LP¹⁹²TPVD P¹⁹⁷ERV²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 116
 LP¹⁹²TPSD P¹⁹⁷ERV²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 117
 LP¹⁹²VPTD P¹⁹⁷ERV²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 118
 LP¹⁹²TPAD P¹⁹⁷ERV²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 119

- 5 Región 6(b): en estos mutantes la P¹⁹⁷ERV²⁰¹ELYKD (SEQ ID NO: 111) de tipo silvestre se reemplaza con P¹⁹⁷123P²⁰¹45678 donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), donde al menos uno es treonina (T) o serina (S), y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los ejemplos preferidos incluyen:

P¹⁹⁷TAS P²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 120
 P¹⁹⁷TAS P²⁰¹ALYKD; SEQ ID NO: 121
 P¹⁹⁷NTL P²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 122
 P¹⁹⁷ETV P²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 123
 P¹⁹⁷QET P²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 124
 P¹⁹⁷TQG P²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 125
 P¹⁹⁷TQG P²⁰¹ALYKD; SEQ ID NO: 126
 P¹⁹⁷QGT P²⁰¹ALYKD; SEQ ID NO: 127
 P¹⁹⁷ATE P²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 128
 P¹⁹⁷TTQ P²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 129
 P¹⁹⁷TTE P²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 130
 P¹⁹⁷ERV²⁰¹TLYKD; SEQ ID NO: 131
 P¹⁹⁷ERV²⁰¹TLYAD; SEQ ID NO: 132
 P¹⁹⁷ERV²⁰¹TQGAD; SEQ ID NO: 133
 P¹⁹⁷ERV²⁰¹TQGAMP; SEQ ID NO: 134
 P¹⁹⁷ERV²⁰¹TQGA; SEQ ID NO: 135
 P¹⁹⁷TQAP²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 359
 P¹⁹⁷TEIP²⁰¹ELYKD; SEQ ID NO: 360

7. Región 7

- 10 En estos mutantes, la L²⁰⁸MY T²¹¹ (SEQ ID NO: 8) de tipo silvestre, se reemplaza con 123(4)_a(5)_b(6)_c(x) donde 1, 2, 3, 4, 5, se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, o ácido glutámico (E), donde al menos uno es treonina (T) o serina (S), y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos treonina o serina para crear un sitio de glucosilación unido a O. Los símbolos a, b y c representan independientemente 0 o 1, y (x) se selecciona de OH, NH₂, glicina, alanina, leucina y asparagina. Los ejemplos preferidos incluyen:

L²⁰⁸MY T²¹¹P(x); SEQ ID NO: 136
 L²⁰⁸TE T²¹¹P(x); SEQ ID NO: 137
 VTE T²¹¹P(x); SEQ ID NO: 138
 GVTE T²¹¹PL(x); SEQ ID NO: 139
 PELYGVTC T²¹¹PL(x); SEQ ID NO: 140
 L²⁰⁸MY T²¹¹(x); SEQ ID NO: 141
 L²⁰⁸MY T²¹¹PTASP; SEQ ID NO: 142

L²⁰⁸MY T²¹¹PATEP; SEQ ID NO: 143
 L²⁰⁸MY T²¹¹PTP(x); SEQ ID NO: 144
 L²⁰⁸MY T²¹¹PTAP(x); SEQ ID NO: 145

5 La numeración de los restos de aminoácidos se basa en la secuencia inicial no modificada donde el resto más N terminal se numera con 1. La numeración de aminoácidos no modificados permanece invariable después de la modificación. En un mutante de FGF de la presente invención puede haber más de una de las modificaciones de secuencia descritas anteriormente.

EJEMPLO 2

10 Una biblioteca de péptidos FGF-20 cada uno de ellos con un posible sitio de glucosilación unido a O, como se describió en el Ejemplo 1, se expresó en *E. coli* o usando procedimientos de traducción *in vitro*. La proteína se purificó con un procedimiento de unión a heparina de captura IMAC y la actividad biológica *in vitro* se sometió a ensayo. Las secuencias de proteína que conservan la actividad *in vitro* se ensayaron como aceptores para la GlucoPEGilación. Los FGF-20 glucoPEGilados (ramificados de 40 kDa) se purificaron para evaluación biológica adicional como se ha indicado anteriormente.

EJEMPLO 3

15 En la tabla 7 anterior se muestran ejemplos de regiones ejemplares en FGF-21 que son adecuadas para la introducción de sitios de glucosilación por mutación. En todos los casos, la Met N terminal puede estar presente o ausente en cualquier mutante de FGF. La numeración de los restos de aminoácidos se basa en la secuencia inicial no modificada donde el resto más izquierda, la metionina, se numera como posición 1. Para destacar cómo difiere la secuencia mutante con respecto a la secuencia no modificada, la numeración de los aminoácidos no modificados como aparece en las secuencias más adelante permanece invariable después de la modificación. En un mutante de FGF de la presente invención puede haber más de una de las modificaciones de secuencia descritas. Específicamente, las regiones preferidas para la introducción de mutaciones para crear uno o más sitios de glucosilación no presentes en el péptido de tipo silvestre son las secuencias de nucleótidos que codifican: los aminoácidos 1-8 (REGIÓN 1; SEQ ID NO: 147), aminoácidos 9-13 (REGIÓN 2; SEQ ID NO: 148), aminoácidos 46-54 (REGIÓN 3; SEQ ID NO: 149), aminoácidos 60-65 (REGIÓN 4; SEQ ID NO: 150), aminoácidos 78-83 (REGIÓN 5; SEQ ID NO: 151), aminoácidos 86-91 (REGIÓN 6; SEQ ID NO: 152) o aminoácidos 112-141 (REGIÓN 7; SEQ ID NO: 153), aminoácidos 149-157 (REGIÓN 8; SEQ ID NO: 154), aminoácidos 160-166 (REGIÓN 9; SEQ ID NO: 155), aminoácidos 167-172 (REGIÓN 10; SEQ ID NO: 156), aminoácidos 173-182 (REGIÓN 11; SEQ ID NO: 157) de la secuencia de aminoácidos de FGF-121 de tipo silvestre (véase la tabla 7) pueden mutarse de tal manera que un sitio de glucosilación unido a N o unido a O se introduce en el polipéptido FGF-21 mutante resultante.

30 El siguiente ejemplo describe mutaciones de secuencias de aminoácidos que introducen restos de asparagina, por ejemplo, unidos a N, y sitios de glucosilación unidos a O, por ejemplo, restos de serina o treonina, en un sitio que contiene preferiblemente prolina de una secuencia del Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre o cualquier versión de la misma modificada.

1. Región 1

35 En los mutantes de la Región 1, el extremo N de un FGF-21 de tipo silvestre, M¹HPIPDSS (SEQ ID NO: 147) se subdivide en tres regiones; Región 1(a) M¹HP³ (SEQ ID NO: 158); Región 1(b) M¹HPIP (SEQ ID NO: 159); y Región 1(c) P⁵DSS (SEQ ID NO: 160). A continuación, las mutaciones en cada región se consideran individualmente.

40 Región 1(a): en estos mutantes, la M¹HP³ (SEQ ID NO: 158) de tipo silvestre, se reemplaza con M¹X_nB_oO_rJ_qP³ donde B, O, J se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, donde X es cualquier aminoácido no cargado, o histidina (H), y donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos n, o, q, r representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

M¹VTP³ SEQ ID NO: 161
 M¹QTP³; SEQ ID NO: 162
 M¹ATP³; SEQ ID NO: 163
 M¹IATP³; SEQ ID NO: 164

45 Región 1(b): en estos mutantes, la M¹HPIP (SEQ ID NO: 159) de tipo silvestre, se reemplaza con M¹X_nPB_oP donde B se selecciona independientemente de cualquier aminoácido no cargado y donde X es cualquier aminoácido no cargado, o histidina (H), y donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos n, o representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

M¹FPTP; SEQ ID NO: 165
M¹HPTP; SEQ ID NO: 166
M¹APTP; SEQ ID NO: 167
M¹FPSP; SEQ ID NO: 168
M¹HPSP; SEQ ID NO: 169
M¹APSP; SEQ ID NO: 170
M¹SPTP; SEQ ID NO: 171

5 Región 1(c): en estos mutantes, la P⁵DSS (SEQ ID NO: 160) de tipo silvestre, se reemplaza con P⁵B_oO_rJ_q donde B, O, J se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado y donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos o, q, r, s representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

P⁵TSS; SEQ ID NO: 172
P⁵TQA; SEQ ID NO: 173
P⁵TAQ; SEQ ID NO: 174
P⁵TIE; SEQ ID NO: 175
P⁵SSS; SEQ ID NO: 176

2. Región 2

10 En estos mutantes, la P⁹L¹⁰LQF (SEQ ID NO: 148) de tipo silvestre, se reemplaza con P⁹J_qX_nO_rU_s donde X, J, O, U se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos q, n, r, s representan independientemente 0-3. Los ejemplos preferidos incluyen:

P⁹T¹⁰TQF; SEQ ID NO: 177
P⁹T¹⁰INT; SEQ ID NO: 178
P⁹T¹⁰QGA; SEQ ID NO: 179
P⁹T¹⁰QGF; SEQ ID NO: 180
P⁹T¹⁰TVS; SEQ ID NO: 181
P⁹T¹⁰QAF; SEQ ID NO: 182

3. Región 3

15 En estos mutantes, la ADQSP⁵⁰ESLL (SEQ ID NO: 149) de tipo silvestre se reemplaza con 1_tØZ_mB_oP⁵⁰J_qX_nO_rU_s donde Ø, Z, X, B, J, O, U, 1, 2, 3 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, donde Z o J se seleccionan independientemente como ácido glutámico (E), donde 2 y X se seleccionan independientemente de lisina (K) o asparagina (R), y donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos t, m, n, o, q, r, s, t representan independientemente 0-3. Los ejemplos preferidos incluyen:

ADQSP⁵⁰TSLL; SEQ ID NO: 183
ADQSP⁵⁰TTVS; SEQ ID NO: 184
ADQSP⁵⁰TINT; SEQ ID NO: 185
ADQSP⁵⁰TQAL; SEQ ID NO: 186
ADQSP⁵⁰TQGA; SEQ ID NO: 187
ADQSP⁵⁰TQAL; SEQ ID NO: 188
ATQSP⁵⁰ESLL; SEQ ID NO: 189
ATESP⁵⁰ESLL; SEQ ID NO: 190
ATETP⁵⁰ESLL; SEQ ID NO: 191
VTQSP⁵⁰ESLL; SEQ ID NO: 192

VTETP⁵⁰ESLL; SEQ ID NO: 193

ATESP⁵⁰ASLL; SEQ ID NO: 194

4. Región 4

- 5 En estos mutantes, la KP⁶¹GVIQ (SEQ ID NO: 150) de tipo silvestre, se reemplaza con B_oP⁶¹J_qX_nO_rU_s donde B se selecciona de lisina (K) o cualquier aminoácido no cargado, donde X, J, O, U se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado y donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos n, o, q, r, s representan independientemente 0-3. Los ejemplos preferidos incluyen:

SP⁶¹TVIQ; SEQ ID NO: 195

AP⁶¹TVIQ; SEQ ID NO: 196

SP⁶¹TTVS; SEQ ID NO: 197

SP⁶¹TINT; SEQ ID NO: 198

SP⁶¹TQAQ; SEQ ID NO: 199

SP⁶¹TQGA; SEQ ID NO: 200

SP⁶¹TVIA; SEQ ID NO: 201

AP⁶¹TTVS; SEQ ID NO: 202

AP⁶¹TINT; SEQ ID NO: 203

5. Región 5

- 10 En estos mutantes, la RP⁷⁹DGAL (SEQ ID NO: 151) de tipo silvestre, se reemplaza con B_oP⁷⁹J_qX_nO_rU_s donde X, B, J, O, U se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, donde B puede seleccionarse independientemente de lisina o arginina (R) y donde al menos uno es T o S y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos n, o, q, r, s representan independientemente 0-3. Los ejemplos preferidos incluyen:

SP⁷⁹TGAL; SEQ ID NO: 204

AP⁷⁹TGAL; SEQ ID NO: 205

SP⁷⁹TINT; SEQ ID NO: 206

SP⁷⁹TTVS; SEQ ID NO: 207

SP⁷⁹TQAL; SEQ ID NO: 208

AP⁷⁹TQAL; SEQ ID NO: 209

SP⁷⁹TQGA; SEQ ID NO: 210

SP⁷⁹TQGAM; SEQ ID NO: 211

15

6. Región 6

- 20 En estos mutantes, la SLHFDP⁹¹ (SEQ ID NO: 152) de tipo silvestre se reemplaza con 21_tØZ_mB_oP⁹¹ donde Ø, Z, B, 1, 2 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, y donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos t, m, o representan independientemente 0-3. Los ejemplos preferidos incluyen:

SLTFTP⁹¹; SEQ ID NO: 212

SLTETP⁹¹; SEQ ID NO: 213

SVTETP⁹¹; SEQ ID NO: 214

7. Región 7

- 25 En estos mutantes, la A¹¹²HGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLP (SEQ ID NO: 153) de tipo silvestre, se subdivide en cinco regiones; Región 7(a) AHGLP¹¹⁶LHLP¹²⁰ (SEQ ID NO: 215); Región 7(b) HLP¹²⁰GNKSP¹²⁵HR (SEQ ID NO: 216); Región 7(c) KSP¹²⁵HRDP¹²⁹APR (SEQ ID NO: 217); Región 7(d) RGP¹³⁴ARFLP¹³⁹LP (SEQ ID

NO: 218); y Región 7(e) RGP¹³⁴ARFLP¹³⁹LP (SEQ ID NO: 219). A continuación, las mutaciones en cada región se consideran individualmente

5 Región 7(a): en estos mutantes, la AHGLP¹¹⁶LHLP¹²⁰ (SEQ ID NO: 215) de tipo silvestre, se reemplaza con $1_t\emptyset Z_m B_o P^{116} J_q X_n O_r P^{120}$ donde 1, \emptyset , Z, X, B, J, O se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado y donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos t, m, o, q, n, r representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

ATGTP¹¹⁶LHLP¹²⁰; SEQ ID NO: 220
 ATETP¹¹⁶LHLP¹²⁰; SEQ ID NO: 221
 VTETP¹¹⁶LHLP¹²⁰; SEQ ID NO: 222
 VTGLP¹¹⁶LHLP¹²⁰; SEQ ID NO: 223
 ATGLP¹¹⁶LHLP¹²⁰; SEQ ID NO: 224
 AHGLP¹¹⁶TQAP¹²⁰; SEQ ID NO: 225
 AHGLP¹¹⁶TAQP¹²⁰; SEQ ID NO: 226
 AHGLP¹¹⁶TEIP¹²⁰; SEQ ID NO: 227
 AHGLP¹¹⁶TSSP¹²⁰; SEQ ID NO: 228
 AHGLP¹¹⁶TALP¹²⁰; SEQ ID NO: 229
 ASGLP¹¹⁶TQAP¹²⁰; SEQ ID NO: 230
 ASGLP¹¹⁶TEIP¹²⁰; SEQ ID NO: 231

10 Región 7(b): en estos mutantes, la HLP¹²⁰GNKSP¹²⁵HR (SEQ ID NO: 216) de tipo silvestre, se reemplaza con $1_t LP^{120} X_n O_r U_s 2_a P^{125} B_o J_q$ donde X, B, J, O, U, 1, 2 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, donde B, J, 1 se seleccionan independientemente como histidina (H), lisina (K) o arginina (R), y donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos t, n, r, s, a, o, q representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

HLP¹²⁰TTAVP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 232
 HLP¹²⁰TSGEP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 233
 HLP¹²⁰GSTAP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 234
 HLP¹²⁰GNTSP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 235
 HLP¹²⁰GTESP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 236
 HLP¹²⁰LTQTP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 237
 HLP¹²⁰GTQTP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 238
 HLP¹²⁰LTQTP¹²⁵AR; SEQ ID NO: 239
 HLP¹²⁰TNASP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 240
 HLP¹²⁰TQGSP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 241
 HLP¹²⁰VTSQP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 242
 HLP¹²⁰TINTP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 243
 HLP¹²⁰TSVSP¹²⁵HR; SEQ ID NO: 244

15 Región 7(c): en estos mutantes, la KSP¹²⁵HRDP¹²⁹APR (SEQ ID NO: 217) de tipo silvestre se reemplaza con $1_t SP^{125} X_n O_r U_s P^{129} B_o PJ_q$ donde B, U, 1 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, donde X, O, J se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado o histidina (H), lisina (K) o arginina (R) y donde al menos uno es T o S y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos t, n, r, s, o, q representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

KSP¹²⁵TAQP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 245
 KSP¹²⁵TADP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 246
 ASP¹²⁵TAQP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 247
 SSP¹²⁵TADP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 248

KSP¹²⁵TSDP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 249
 KSP¹²⁵TEIP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 250
 KSP¹²⁵TEIP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 251
 KSP¹²⁵TEDP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 252
 ASP¹²⁵TEDP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 253
 SSP¹²⁵TADP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 254
 SSP¹²⁵TAQP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 255
 KSP¹²⁵TQAP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 256
 SSP¹²⁵TQAP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 257
 ASP¹²⁵TEIP¹²⁹APR; SEQ ID NO: 258
 KSP¹²⁵HRDP¹²⁹TPR; SEQ ID NO: 259
 KSP¹²⁵HRDP¹²⁹SPR; SEQ ID NO: 260
 KSP¹²⁵HRDP¹²⁹TPA; SEQ ID NO: 261
 KSP¹²⁵HRDP¹²⁹TPS; SEQ ID NO: 262
 KSP¹²⁵HSDP¹²⁹TPA; SEQ ID NO: 263
 KSP¹²⁵HADP¹²⁹TPS; SEQ ID NO: 264
 KSP¹²⁵HADP¹²⁹TPA; SEQ ID NO: 265

5 Región 7(d): en estos mutantes, la RGP¹³⁴ARFLP¹³⁹LP (SEQ ID NO: 218) de tipo silvestre se reemplaza con 1_tGP¹³⁴X_nO_rU_s2_aP¹³⁹B_oP donde X, B, O, U, 1, 2 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, donde O, 1 se seleccionan independientemente de lisina (K) o arginina (R), y donde al menos uno es T o S y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos t, n, r, s, a, o representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

RGP¹³⁴TSFLP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 266
 RGP¹³⁴TSGEP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 267
 RGP¹³⁴GSTAP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 268
 RGP¹³⁴ANTSP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 269
 RGP¹³⁴ATESP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 270
 RGP¹³⁴ATQTP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 271
 RGP¹³⁴ATQTP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 272
 RGP¹³⁴LTQTP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 273
 RGP¹³⁴TQFLP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 274
 RGP¹³⁴TSFLP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 275
 RGP¹³⁴VTSQP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 276
 SGP¹³⁴TSFLP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 277
 AGP¹³⁴TSGEP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 278
 SGP¹³⁴TSALP¹³⁹LP; SEQ ID NO: 279

10 Región 7(e): en estos mutantes, la RGP¹³⁴ARFLP¹³⁹LP (SEQ ID NO: 219) de tipo silvestre se reemplaza con 1_tGP¹³⁴X_nO_rU_s2_aP¹³⁹B_oP donde X, B, O, U, 1, 2 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, donde O, 1 se seleccionan independientemente de lisina (K) o arginina (R), donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos t, n, r, s, a, o representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

RGP¹³⁴ARFLP¹³⁹TP; SEQ ID NO: 280
 RGP¹³⁴ARFLP¹³⁹SP; SEQ ID NO: 281
 RGP¹³⁴ASFLP¹³⁹TP; SEQ ID NO: 282

8. Región 8

5 En estos mutantes, la EPP¹⁵¹GILAP¹⁵⁶Q (SEQ ID NO: 154) de tipo silvestre se reemplaza con B_oPP¹⁵¹X_nO_rU_s2_aP¹⁵⁶1_t donde B, X, O, U, 2, 1 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, donde al menos uno es T o S y es un sustrato para la GalNac transferasa donde GalNac se añade a al menos T o S. Los símbolos o, n, r, s, a, t representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

TPP¹⁵¹GILAP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 283
 SPP¹⁵¹GILAP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 284
 EPP¹⁵¹TILAP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 285
 EPP¹⁵¹TTLAP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 286
 EPP¹⁵¹TQLAP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 287
 EPP¹⁵¹TQGAP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 288
 EPP¹⁵¹TSGEP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 289
 EPP¹⁵¹GSTAP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 290
 EPP¹⁵¹TTAVP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 291
 EPP¹⁵¹GNTSP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 292
 EPP¹⁵¹GTESP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 293
 EPP¹⁵¹GTETP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 294
 EPP¹⁵¹VTSQP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 295
 EPP¹⁵¹AVQTP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 296
 EPP¹⁵¹LTQTP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 297
 EPP¹⁵¹VTSQP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 298
 EPP¹⁵¹SSGAP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 299
 EPP¹⁵¹TINTP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 300
 EPP¹⁵¹TTVSP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 301
 EPP¹⁵¹TQAAP¹⁵⁶Q; SEQ ID NO: 302
 EPP¹⁵¹GILAP¹⁵⁶T; SEQ ID NO: 303
 EPP¹⁵¹GILAP¹⁵⁶S; SEQ ID NO: 304

9. Región 9

10 En estos mutantes, la DVGSSDP¹⁶⁶ (SEQ ID NO: 155) de tipo silvestre se reemplaza con X_nO_rU_s2_aB_oZ_mP¹⁶⁶ donde Z, X, B, O, U, 2 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), y donde al menos uno es T o S, y es un sustrato para la GalNac transferasa donde GalNac se añade a al menos T o S. Los símbolos n, r, s, a, o, m representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

TVGSSDP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 305
 DVGSSTP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 306
 DVGTEP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 307
 DAASAAP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 308
 DAATAAP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 309
 DVGTSDP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 310
 DVATSDP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 311
 TGDSSDP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 312
 TDASGAP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 313
 DVGTSGP¹⁶⁶; SEQ ID NO: 314

10. Región 10

En estos mutantes la LSMVGP¹⁷² (SEQ ID NO: 156) de tipo silvestre se reemplaza con X_nO_rU_s2_aB_oP¹⁷² donde B, O, U, 2 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), donde al menos X se selecciona como cualquier T o S, y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos n, r, s, a, o representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

5

TSMVGP; SEQ ID NO: 315
 TSGVGP; SEQ ID NO: 316
 TSGAMP; SEQ ID NO: 317
 TQGAMP; SEQ ID NO: 318
 TSMVGP; SEQ ID NO: 319
 TQGAMP; SEQ ID NO: 320

11. Región 11

En estos mutantes la SQGRSP¹⁷⁸SYAS (SEQ ID NO: 157) de tipo silvestre se subdivide en dos regiones; Región 11(a) SQGRSP¹⁷⁸ (SEQ ID NO: 321); y la Región carboxilo terminal 11(b) RSO¹⁷⁸SYAS (SEQ ID NO: 322). A continuación, las mutaciones en cada región se consideran individualmente.

10

Región 11(a): En estos mutantes, la SQGRSP¹⁷⁸ (SEQ ID NO: 321) de tipo silvestre se reemplaza con X_nO_rU_s2_aB_oP¹⁷⁸ donde B, O, U, 2 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácidos cargado, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), donde al menos X se selecciona como cualquiera de T o S y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos To S. Los símbolos n, r, s, a, o representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

15

SQGASP¹⁷⁸; SEQ ID NO: 323
 TQGASP¹⁷⁸; SEQ ID NO: 324
 TQGAMP¹⁷⁸; SEQ ID NO: 325
 TQGAMP¹⁷⁸; SEQ ID NO: 326

Región 11(b): En estos mutantes, la RSP¹⁷⁸ SYAS (SEQ ID NO: 322) de tipo silvestre se reemplaza con ZSP¹⁷⁸X_nO_rU_s1B_o23 donde Z, X, B, O, U, 1, 2, 3 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido no cargado, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), donde al menos X se selecciona como cualquiera de T o S, donde Z puede seleccionarse independientemente como arginina (R) o lisina (K) y es un sustrato para la GalNAc transferasa donde GalNAc se añade a al menos T o S. Los símbolos n, r, s, o representan independientemente 0-3. Las mutaciones preferidas incluyen:

20

ASP¹⁷⁸SYAS; SEQ ID NO: 327
 RSP¹⁷⁸TSAVAA; SEQ ID NO: 328
 ASP¹⁷⁸TSAVAA; SEQ ID NO: 329
 ASP¹⁷⁸SSGAPPPS; SEQ ID NO: 330
 ASP¹⁷⁸SSGAPP; SEQ ID NO: 331
 ASP¹⁷⁸SSGAP; SEQ ID NO: 332
 RSP¹⁷⁸SSGAPPPS; SEQ ID NO: 333
 ASP¹⁷⁸TINT; SEQ ID NO: 334
 ASP¹⁷⁸TSVS; SEQ ID NO: 335
 ASP¹⁷⁸TQAF; SEQ ID NO: 336
 ASP¹⁷⁸TINTP; SEQ ID NO: 337

EJEMPLO 4

25 Expresión soluble de FGF-20 y FGF-21 en *E. coli*

Las proteínas terapéuticas se expresan comúnmente en *E. coli* como cuerpos de inclusión insolubles, inactivos. Después de la purificación de los cuerpos de inclusión, los compuestos solubles se obtienen por una reacción de

replegamiento de la proteína. Este proceso de replegamiento se potencia típicamente por la inclusión de compuestos que facilitan el rebarajado de enlaces disulfuro.

El citoplasma de *E. coli*, el sitio de expresión de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión, es un entorno químicamente reductor que inhibe la formación de enlaces disulfuro. Una cepa que tiene un citoplasma más oxidante, menos reductor permitiría teóricamente la formación de enlaces disulfuro, facilitando la expresión de proteínas terapéuticas en una forma soluble.

Experimentos:

Las proteínas terapéuticas ensayadas fueron FGF-20 y FGF-21 humanos. La construcción FGF-21 carecía de su secuencia señal N terminal. Los genes que codificaban estas proteínas terapéuticas se clonaron en hasta cuatro estructuras vectoriales diferentes (Vector n.º 1, Vector n.º 2, Vector n.º 3 y pET24a) como se indica en la Tabla 8. Estas construcciones se ensayaron en una o dos de cuatro cepas bacterianas diferentes (W3110, BL21 DE3, *E. coli*_{(trxb,gor,supp)-2} y *E. coli*_{(trxb,gor,supp)-2} DE3) como se indica en la Tabla 8.

Para la expresión de proteínas, se usó un cultivo a pequeña escala durante una noche para inocular un cultivo de 100 ml de LB martone previamente calentado que contenía kanamicina 50 µg/ml. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación y se la DO₆₂₀ se monitorizó. Cuando la DO₆₂₀ alcanzó 0,4-0,6, los cultivos se dividieron y se transfirieron a una incubadora con agitación a 37 °C o 20 °C durante 15-20 minutos. Después, se añadió IPTG a una concentración final de 0,1-1,0 mM y la incubación con agitación continuó durante 1,5 horas hasta toda la noche. Las células se recogieron por centrifugación a 4 °C, 7000xg durante 15 minutos en un Sorvall RC3C+.

Para el análisis del extracto de células enteras de la expresión de proteínas, se recogieron las células de una alícuota de 150 µl de los cultivos inducidos por centrifugación y se efectuó la lisis en 1xPBS/SDS al 0,1 %. Después de calentar con DTT 100 mM y con tampón de muestra de proteína 1x, las muestras se resolvieron con SDS-PAGE y se tiñeron con naranja fluorescente de Coomassie.

Para el análisis de la solubilidad de proteínas, los sedimentos celulares bacterianos de 50-100 ml de cultivos inducidos se resuspendieron usando ~30 ml de tampón de lisis (p. ej., 1x PBS, EDTA 5 mM), y se efectuó la lisis con alteración mecánica de tres pases a través de un microfluidizador. Se tomaron muestras pequeñas y el material insoluble se sedimentó por centrifugación durante 10 minutos a una velocidad máxima a 4 °C en una microcentrífuga. Después de la centrifugación, el sobrenadante se separó del sedimento y ambos se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con proteínas. También se realizó análisis de transferencia western con anticuerpos específicos para las proteínas terapéuticas para verificar la identidad de las proteínas solubles observadas.

Resultados:

FGF-20

Los vectores portadores de FGF-20 se transformaron en cepas bacterianas diferentes como se indica en la Tabla 8. Se analizaron cultivos de inducción de 50-100 ml, con variación de temperatura, oxigenación (rpm), concentración de IPTG y tiempo, mediante SDS-PAGE de extractos de células enteras (WCE, por las siglas *whole cell extracts*). Como se muestra en la FIG. 1a, en el Vector n.º 2, Vector n.º 3 y vector pET24a, pero no en el Vector n.º 1, se observó expresión moderada. La expresión se observó al cabo de tan solo 1,5 horas después de la inducción y los niveles de expresión más altos fueron a 37 °C en comparación con 20 °C.

Para determinar si FGF-20 se expresaba como una proteína soluble, se efectuó la lisis de los sedimentos de las células inducidas de las cepas BL21 DE3 y *E. coli*_{(trxb,gor,supp)-2} DE3 portadoras de pET24a FGF-20, se centrifugaron y analizaron mediante SDS-PAGE. Como se muestra en la FIG. 1b, la mayor parte de FGF-20 fue soluble en las células de *E. coli*_{(trxb,gor,supp)-2} DE3 cuando se cultivaron a 20 °C. El cultivo a 37 °C produjo aproximadamente la misma cantidad de proteína soluble e insoluble tanto en células BL21 DE3 como en *E. coli*_{(trxb,gor,supp)-2} DE3.

FGF-21

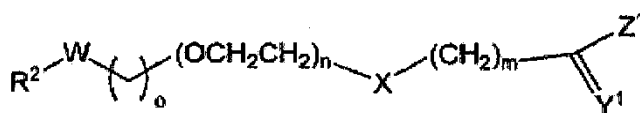
Los vectores portadores de FGF-21 se transformaron en cepas bacterianas diferentes como se indica en la Tabla 8. Se analizaron cultivos de inducción de 100 ml, con variaron de temperatura y tiempo, mediante SDS-PAGE WCE. Como se muestra en la FIG. 1c, en el Vector n.º 2, Vector n.º 3 y vector pET24a, pero no en el Vector n.º 1, se observó expresión. La expresión se observó al cabo de tan solo 1,5 horas después de la inducción. Como rFGF-21 se observó para resolver mediante SDS-PAGE aproximadamente a 3-5 kDa más grande que lo esperado ~19.7 kDa, la identidad de la banda inducida se confirmó mediante transferencia western (FIG. 1c).

Para determinar si FGF-21 se expresaba como una proteína soluble, se efectuó la lisis de los sedimentos de las células inducidas de las cepas W3110 y *E. coli*_{(trxb,gor,supp) 2} portadoras del Vector n.º 3 FGF-21, se centrifugaron y analizaron mediante SDS-PAGE. Como se muestra en la FIG. 1d, la mayor parte de FGF-21 fue soluble solo en las células *E. coli*_(trxb,gor,supp) cuando se indujeron a 20 °C. La inducción en células de *E. coli*_{(trxb,gor,supp)-2} a 37 °C o en células W3110 a cualquiera temperatura produjo una proteína predominantemente insoluble.

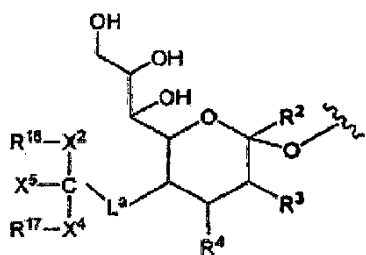
Este estudio demuestra un procedimiento para expresar las proteínas terapéuticas FGF-20 y FGF-21 en bacterias como proteínas solubles. La técnica de expresión usando *E. coli*_(trxb,gor,supp)-2 descrita en la presente memoria debe ser aplicable para la expresión soluble de otras proteínas terapéuticas.

Algunas realizaciones de la invención se describen en los siguientes apartados:

- 5 1. Un conjugado del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) que comprende: un péptido FGF; y un grupo modificador, donde dicho grupo modificador está unido de manera covalente con dicho péptido en un resto de aminoácido o glucosilo preseleccionado de dicho péptido mediante un grupo de enlace glucosilo intacto.
2. El conjugado FGF del apartado 1, donde dicho péptido FGF es un miembro seleccionado de FGF-I, FGF-2, FGF-18, FGF-20 y FGF-21.
- 10 3. El conjugado FGF del apartado 1, donde dicho péptido FGF tiene una homología de al menos 95 % con al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1,9-14, 18-45, 48-65, 69-109, 112-146, 161-214, 220-320 y 323-360.
4. El conjugado FGF del apartado 1, donde dicho grupo modificador está unido de manera covalente a dicho resto de glucosilo preseleccionado.
- 15 5. El conjugado FGF del apartado 4, donde dicho grupo modificador es un grupo modificador no glucosídico.
6. El conjugado FGF del apartado 5, donde dicho grupo modificador no glucosídico es un miembro seleccionado de PEG lineal y PEG ramificado.
7. El conjugado FGF del apartado 6, donde dicho residuo PEG es PEG lineal y dicho PEG lineal tiene una estructura según la siguiente fórmula:

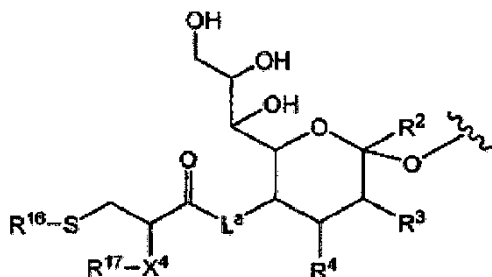


- 20 en la que
- R^2 es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, por ejemplo , acetal, OHC-, $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{CH}_2-$, $\text{HS-CH}_2\text{CH}_2-$ y $-(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{Y}^1)\text{Z}^2$;
- 25 -nucleótido de azúcar o proteína;
- n es un número entero seleccionado de 1 a 2500; m , o y q son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 20;
- Z es un miembro seleccionado de OH, NH_2 , halógeno, S-R^3 , la porción de alcohol de ésteres activados, $-(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{Y}^2)\text{V}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{U}(\text{CH}_2)_s\text{C}(\text{Y}^2)_v$, nucleótido de azúcar, proteína y grupos salientes, por ejemplo, imidazol, p-nitrofenilo, HOBT, tetrazol, haluro;
- 30 X , Y^1 , Y^2 , W y U se seleccionan independientemente de O, S, N-R^4 ;
- V es un miembro seleccionado de OH, NH_2 , halógeno, S-R^5 , el componente alcohol de ésteres activados, el componente amina de amidas activadas, nucleótidos de azúcar y proteínas;
- p , s y v son números enteros independientemente seleccionados de 0 a 20; y
- 35 R^3 , R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir.
8. El conjugado de FGF del apartado 1, en donde dicho grupo de unión a glucosilo tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



en donde R^2 es H, CH_2OR^7 , $COOR^7$ u OR^7 en donde R^7 representa H, alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir; R^3 y R^4 son miembros independientemente seleccionados de H, alquilo sustituido o sin sustituir, OR^8 , $NHC(O)R^9$ en donde

- 5 R^8 y R^9 se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir o ácido siálico; L^3 es un enlazador seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir; R^{16} y R^{17} son independientemente brazos poliméricos seleccionados; X^2 y X^4 son independientemente fragmentos de unión seleccionados que se unen a residuos poliméricos R^{16} y R^{17} a C; y X^5 es un grupo no reactivo.
- 10 9. El conjugado de FGF del apartado 8, en donde dicho grupo de unión a glucosilo tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



10. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende un sitio de glucosilación unido a N o unido a O recién introducido que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente.
- 15 11. El ácido nucleico del apartado 10, donde el ácido nucleico codifica un Factor-20 de Crecimiento de Fibroblastos mutante que tiene una secuencia de aminoácidos del Factor-20 de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente que tiene una homología de al menos 95 % con la SEQ ID NO: 1.
- 20 12. El ácido nucleico del apartado 10, donde el sitio de glucosilación recién introducido está cerca de un resto de prolina.
13. El ácido nucleico del apartado 12, donde el resto de prolina se localiza en la posición 3, 28, 29, 34, 35, 52, 81, 175, 192, 197 o 201 de la SEQ ID NO: 1.
- 25 14. El ácido nucleico del apartado 10, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante tiene una homología de al menos 95 % con al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109, 112-145, 161-214, 220-320 y 323-360.
15. El ácido nucleico del apartado 10, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido.
16. Un casete de expresión que comprende el ácido nucleico del apartado 10.
- 30 17. Una célula que comprende el ácido nucleico del apartado 10.
18. Un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, que comprende un sitio de glucosilación unido a N o unido a O recién introducido.
19. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante del apartado 18, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % con la SEQ ID NO: 1.
- 35 20. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante del apartado 18, donde el sitio de glucosilación recién introducido está cerca de un resto de prolina.

21. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante del apartado 20, donde el resto de prolina se localiza en la posición 3, 28, 29, 34, 35, 52, 81, 175, 192, 197 o 201 de la SEQ ID NO: 1.
- 5 22. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante del apartado 18, donde el dicho FGF mutante tiene una homología de al menos 95 % con al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109, 112-145, 161-214, 220-320 y 323- 360.
23. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante del apartado 18, donde Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido.
24. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante del apartado 18, que comprende un polímero soluble en agua unido a un sitio de glucosilación a través de un enlazador de glucosilo.
- 10 25. El Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante del apartado 24, donde dicho enlazador de glucosilo es un enlazador de glucosilo intacto.
26. Un procedimiento para producir un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, que comprende una glucosilación unida a N o unida a O recién introducida que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente, que comprende las etapas de: (a) producir de manera recombinante el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante; y (b) glucosilar el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante en el sitio de glucosilación recién introducido donde dicha glucosilación es un proceso acelular, *in vitro*.
- 15 27. El procedimiento del apartado 26, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % con la SEQ ID NO: 1.
- 20 28. El procedimiento del apartado 26, donde el sitio de glucosilación recién introducido está cerca de un resto de prolina.
29. El procedimiento del apartado 28, donde el resto de prolina se localiza en la posición 3, 28, 29, 34, 35, 52, 81, 175, 192, 197 o 201 de la SEQ ID NO:1.
- 25 30. El procedimiento del apartado 26, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109, 112-145, 161-214, 220-320 y 323-360.
31. El procedimiento del apartado 26, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido.
- 30 32. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, que comprende una glucosilación unida a O o unida a N recién introducida que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente.
33. La composición del apartado 32, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % con la SEQ ID NO: 1.
- 35 34. La composición del apartado 32, donde el sitio de glucosilación recién introducido está cerca de un resto de prolina.
35. La composición del apartado 34, donde resto de prolina se localiza en la posición 3, 28, 29, 34, 35, 52, 81, 175, 192, 197 o 201 de la SEQ ID NO: 1.
- 40 36. La composición del apartado 32, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante tiene una homología de al menos 95 % con al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109, 112-145, 161-214, 220-320 y 323-360.
37. La composición del apartado 32, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido.
- 45 38. Un procedimiento para el tratamiento de un déficit del Factor de Crecimiento de Fibroblastos en un paciente, que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz de un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende una glucosilación unida a N o unida a O recién introducida que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos correspondiente.
39. El procedimiento del apartado 38, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 50 40. El procedimiento del apartado 38, donde el sitio de glucosilación recién introducido está cerca de un resto de

prolina.

41. El procedimiento del apartado 40, donde el resto de prolina se localiza en la posición 3, 28, 29, 34, 35, 52,81, 175, 192, 197 o 201 de la SEQ ID NO: 1.
- 5 42. El procedimiento del apartado 38, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante tiene una homología de al menos 95 % con al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109, 112-145, 161-214, 220-320 y 323- 360.
43. El procedimiento del apartado 38, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido.
- 10 44. Un procedimiento para producir un glucoconjugado de un Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, que comprende una glucosilación unida a N o unida a O recién introducida que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente, que comprende las etapas de: (a) producir de manera recombinante el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante, y (b) glucosilar enzimáticamente el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante con un azúcar modificado en el sitio de glucosilación recién introducido donde dicha glucosilación es un proceso acelular, *in vitro*.
- 15 45. El procedimiento del apartado 44, donde el azúcar modificado se modifica con un polímero soluble en agua.
46. El procedimiento del apartado 45, donde el azúcar modificado se modifica con un polímero soluble en agua seleccionado del grupo que consiste en poli(etilenglicol) y m- poli(etilenglicol).
47. El procedimiento del apartado 44 donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 20 48. El procedimiento del apartado 45, donde el sitio de glucosilación recién introducido está cerca de un resto de prolina.
49. El procedimiento del apartado 44, donde el resto de prolina se localiza en la posición 3, 28, 29, 34, 35, 52, 81, 175, 192, 197 o 201 de la SEQ ID NO:1.
- 25 50. El procedimiento del apartado 44, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-14, 18-45, 48-65, 69-109, 112-145, 161-214, 220-320 y 323-360.
51. El procedimiento del apartado 44, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Neose Technologies, Inc. DeFrees, Shawn

5 <120> Remodelación y glucopegilación del factor de crecimiento de fibroblastos (fgf)

<130> 040853-5163-WO

<140> N/A

10 <141>31-10- 2005

<150> US 60/623, 342

<151> 29-10-2004

15 <160> 360

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 211

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

Met Ala Pro Leu Ala Glu Val Gly Gly Phe Leu Gly Gly Leu Glu Gly
1 5 10 15

Leu Gly Gln Gln Val Gly Ser His Phe Leu Leu Pro Pro Ala Gly Glu
20 25 30

Arg Pro Pro Leu Leu Gly Glu Arg Arg Ser Ala Ala Glu Arg Ser Ala
35 40 45

Arg Gly Gly Pro Gly Ala Ala Gln Leu Ala His Leu His Gly Ile Leu
50 55 60

Arg Arg Arg Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Gln Ile Leu
65 70 75 80

Pro Asp Gly Ser Val Gln Gly Thr Arg Gln Asp His Ser Leu Phe Gly
85 90 95

Ile Leu Glu Phe Ile Ser Val Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly
100 105 110

Val Asp Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Asp Lys Gly Glu Leu Tyr
115 120 125

Gly Ser Glu Lys Leu Thr Ser Glu Cys Ile Phe Arg Glu Gln Phe Glu
130 135 140

25 Glu Asn Trp Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Ile Tyr Lys His Gly Asp
145 150 155 160

ES 2 566 670 T3

Thr Gly Arg Arg Tyr Phe Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg
 165 170 175

Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro
 180 185 190

Arg Pro Val Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Leu Leu
 195 200 205

Met Tyr Thr
 210

5 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 2
 Met Ala Pro Leu Ala Glu Val
 1 5

15 <210> 3
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 3
 Gln Val Gly Ser His Phe Leu Leu Pro Pro Ala Gly Glu Arg Pro Pro
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Glu Arg Arg Ser
 20

25 <210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 4
 Ala Ala Glu Arg Ser Ala Arg Gly Gly Pro Gly Ala Ala Gln Leu Ala
 1 5 10 15

35 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 5

ES 2 566 670 T3

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

Arg Gln

<210> 6

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Motivo de mutación FGF

10

<400> 6

Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

<210> 7

15 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 7

Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu
 1 5 10 15

Leu Tyr Lys Asp Leu Leu
 20

25 <210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 8

Leu Met Tyr Thr

1

<210> 9

<211> 9

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

40 <400> 9

Met Ala Pro Thr Pro Leu Ala Glu Val
 1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 10

Met Val Thr Pro Leu Ala Glu Val

50 1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 11
 Met Ala Pro Thr Thr Glu Val
 1 5

10 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 12
 Met Ala Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Leu Ala Glu Val
 1 5 10

20 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

30 <400> 13
 Met Ala Pro Thr Ser Ser Leu Ala Glu Val
 1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

40 <400> 14
 Met Ala Pro Thr Ala Leu Pro Leu Ala Glu Val
 1 5 10

<210> 15
 45 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 15
 Val Gly Ser His Phe Leu Leu Pro Pro Ala Gly Glu Arg Pro Pro
 1 5 10 15

55 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 16
 Pro Pro Ala Gly Glu Arg Pro Pro
 1 5

5 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 17
 Pro Pro Pro Leu Leu Gly Glu Arg Arg Ser
 1 5 10

15 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 18
 Thr Glu Thr Pro Pro Ala Gly Glu Arg Pro Pro
 1 5 10

25 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

35 <400> 19
 Gly Thr Glu Thr Pro Pro Ala Gly Glu Arg Pro Pro
 1 5 10

40 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 20
 Val Gly Thr Glu Thr Pro Pro Ala Gly Glu Arg Pro Pro
 1 5 10

50 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 21
 Thr Gly Thr Pro Pro Ala Gly Glu Arg Pro Pro
 1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 22
 Thr Ala Thr Pro Pro Ala Glu Glu Arg Pro Pro
 10 1 5 10
 <210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 20 <400> 23
 Pro Pro Thr Gly Glu Ala Pro Pro
 1 5
 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 30 <400> 24
 Pro Pro Thr Gly Glu Val Pro Pro
 1 5
 <210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 40 <400> 25
 Pro Pro Thr Gln Gly Ala Pro Pro
 1 5
 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 50 <400> 26
 Pro Pro Ala Thr Val Ala Pro Pro
 1 5
 55 <210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 27
 Pro Pro Ala Thr Ile Leu Pro Pro
 5 1 5

 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 15 <400> 28
 Pro Pro Ala Gly Thr Ala Pro Pro
 1 5

 <210> 29
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 25
 <400> 29
 Pro Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Pro
 1 5

 <210> 30
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 30
 Pro Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro
 1 5

 40 <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 31
 Pro Pro Ala Gly Thr Ser Pro Pro
 50 1 5

 <210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 32
 Pro Pro Ala Gly Glu Thr Pro Pro
 60 1 5

<210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 33
 Pro Pro Ala Thr Glu Thr Pro Pro
 1 5
 10
 <210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 34
 Pro Pro Gly Thr Glu Thr Pro Pro
 1 5
 20
 <210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 35
 Pro Pro Thr Gly Glu Arg Pro Pro
 1 5
 30
 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 36
 Pro Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro
 1 5
 40
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 37
 Pro Pro Thr Gln Gly Ala Met Arg Ser
 1 5
 50
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 60

<223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 38
 Pro Pro Thr Gln Gly Ala Met Ala Ser
 1 5

5 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 39
 Pro Pro Thr Gln Gly Ala Met Phe Ser
 1 5

15 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 40
 Pro Pro Thr Ser Ser Ser Thr Arg Ser
 1 5

25 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 41
 Pro Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Ser
 1 5

35 <210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 42
 Pro Pro Thr Gly Glu Arg Arg Ser
 1 5

45 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 43
 Pro Pro Thr Thr Gly Val Arg Arg Ser
 1 5

55 <210> 44

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 44
 Pro Pro Thr Thr Gly Glu Ala Arg Ser
 1 5
 10
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 20 <400> 45
 Pro Pro Thr Ala Gly Glu Arg Arg Ser
 1 5
 <210> 46
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF
 30 <400> 46
 Arg Ser Ala Arg Gly Gly Pro
 1 5
 <210> 47
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF
 40 <400> 47
 Pro Gly Ala Ala Gln Leu Ala
 1 5
 45 <210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 48
 Arg Ser Ala Thr Glu Thr Pro
 1 5
 55 <210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 49
 Arg Ser Gly Thr Glu Thr Pro
 1 5
 5
 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 50
 Arg Ser Gly Thr Glu Thr Pro
 1 5
 15
 <210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 51
 Arg Val Gly Thr Glu Thr Pro
 1 5
 25
 <210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 52
 Gly Val Gly Thr Glu Thr Pro
 1 5
 35
 <210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 53
 Gly Ser Ala Thr Glu Thr Pro
 1 5
 45
 <210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 54
 Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro
 1 5
 55
 60

<210> 55
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 55
 Gly Val Thr Glu Thr Pro
 1 5
 <210> 56
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 56
 Gln Thr Glu Leu Pro
 1 5
 <210> 57
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 57
 Gly Val Thr Ser Ala Pro
 1 5
 <210> 58
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 58
 Ser Val Val Thr Pro
 1 5
 <210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 59
 Pro Thr Gly Ala Gln Leu Ala
 1 5
 <210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 60

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 60
 Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro
 5 1 5

 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 15 <400> 61
 Pro Thr Gln Gly Ala Met Ala
 1 5

 <210> 62
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 25 <400> 62
 Pro Thr Thr Ala Gln Leu Ala
 1 5

 <210> 63
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 35 <400> 63
 Pro Gly Ala Thr Gln Leu Ala
 1 5

 40 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 64
 Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ala
 50 1 5

 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 65
 Pro Thr Ser Ser Ser Leu Ala
 60 1 5

<210> 66
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

 10 <400> 66
 His Leu Gln Ile Leu Pro
 1 5

 <210> 67
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF
 20
 <400> 67
 Pro Asp Gly Ser Val Gln Gly Thr
 1 5

 <210> 68
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Motivo de mutación FGF

 <400> 68
 Pro Asn Gly Ser
 1

 35 <210> 69
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 69
 Gln Thr Glu Leu Pro
 1 5
 45
 <210> 70
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 70
 Leu Ile Val Thr Pro
 55 1 5

 <210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 71
 Leu Thr Glu Leu Pro
 1 5
 5

 <210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 15 <400> 72
 Leu Thr Glu Leu Pro
 1 5

 <210> 73
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 25
 <400> 73
 Gly Val Thr Ser Ala Pro
 1 5

 <210> 74
 <211> 6
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 74
 His Leu Thr Glu Thr Pro
 1 5

 40 <210> 75
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 75
 Val Leu Thr Glu Thr Pro
 1 5
 50
 <210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 76
 Val Gly Thr Glu Thr Pro
 1 5
 60

<210> 77
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 10 <400> 77
 Val Gly Val Gly Thr Glu Thr Pro
 1 5

 <210> 78
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 20 <400> 78
 Val Thr Ser Ala Pro
 1 5

 <210> 79
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 79
 Val Ser Thr Pro
 1

 35 <210> 80
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 80
 Glu Ala Thr Pro
 1

 45 <210> 81
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 81
 Pro Thr Gly Ser Val Gly Thr
 55 1 5

 <210> 82
 <211> 8
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 82
 Pro Thr Gln Gly Val Gln Gly Thr
 5 1 5

 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 15 <400> 83
 Pro Thr Gly Ser Val Gly Pro Gly Thr
 1 5

 <210> 84
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 25
 <400> 84
 Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Gly Thr
 1 5

 <210> 85
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 85
 Pro Thr Thr Ser Val Gln Gly Thr
 1 5

 40 <210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 86
 Pro Thr Thr Ala Val Gln Gly Thr
 1 5
 50
 <210> 87
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 87
 Ile Leu Pro Asn Gly Ser Val His
 60 1 5

<210> 88
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 10 <400> 88
 Ile Phe Pro Asn Gly Ser Val
 1 5

 <210> 89
 <211> 4
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 20 <400> 89
 Pro Asn Gly Thr
 1

 <210> 90
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 90
 Leu Pro Asn Gly Thr Val His
 1 5

 35 <210> 91
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 91
 Pro Asn Gly Thr Val
 1 5

 45 <210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 92
 Ile Leu Pro Asn Gly Thr
 55 1 5

 <210> 93
 <211> 7
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

ES 2 566 670 T3

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

5 <400> 93
 Gln Ile Leu Pro Asn Gly Thr
 1 5

<210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

15 <400> 94
 Gln Ile Leu Pro Asn Gly Thr Val His
 1 5

<210> 95
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

25 <400> 95
 Leu Asn Val Thr Glu Thr Pro Arg Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

<210> 96
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

35 <400> 96
 Leu Asn Val Thr Glu Thr Pro Asp Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

<210> 97
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 97
 Leu Asn Val Thr Glu Thr Pro Leu Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

<210> 98
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

60 <400> 98

ES 2 566 670 T3

Leu Asn Ala Ile Thr Thr Pro Arg Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

<210> 99

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

10

<400> 99

Leu Asn Ala Ile Thr Thr Pro Leu Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

<210> 100

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 100

Leu Asn Gln Glu Ala Thr Pro Leu Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

25 <210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 101

Leu Asn Gln Thr Glu Leu Pro Leu Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

35 <210> 102

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 102

Leu Asn Gln Thr Glu Leu Pro Ala Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

45 <210> 103

<211> 16

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

55 <400> 103

Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Thr Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

<210> 104

<211> 16

ES 2 566 670 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 104
 Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Thr Ser Gly Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

10 <210> 105
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 105
 Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Thr Asp Gly Ala Ala Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

20 <210> 106
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 106
 Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Thr Ser Gly Ala Ala Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

30 <210> 107
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

40 <400> 107
 Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Lys Arg His
 1 5 10 15

<210> 108
 <211> 16
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

50 <400> 108
 Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Thr Gln Gly Ala Met Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

<210> 109
 <211> 16
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 60 <223> Secuencia de mutación FGF

ES 2 566 670 T3

<400> 109
 Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Thr Thr Thr Ala Arg Ser Lys Arg His
 1 5 10 15

5 <210> 110
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 110
 Leu Pro Arg Pro Val Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15

15 <210> 111
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 111
 Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10

25 <210> 112
 <211> 16;
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

35 <400> 112
 Leu Pro Ala Pro Thr Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15

40 <210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 113
 Leu Pro Asn Pro Thr Ala Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15

50 <210> 114
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 114
 Leu Pro Arg Pro Thr Ala Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15

ES 2 566 670 T3

<210> 115
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 115
 Leu Pro Ala Pro Thr Gln Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15
 10
 <210> 116
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 116
 Leu Pro Thr Pro Val Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15
 20
 <210> 117
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 30
 <400> 117
 Leu Pro Thr Pro Ser Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15
 35
 <210> 118
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 118
 Leu Pro Val Pro Thr Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15
 45
 <210> 119
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 119
 Leu Pro Thr Pro Ala Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15
 55
 <210> 120
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 120
 Pro Thr Ala Ser Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 5 1 5 10

 <210> 121
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 15 <400> 121
 Pro Thr Ala Ser Pro Ala Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10

 <210> 122
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 25 <400> 122
 Pro Asn Thr Leu Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10

 <210> 123
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 35 <400> 123
 Pro Glu Thr Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10

 <210> 124
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 124
 Pro Gln Glu Thr Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 50 1 5 10

 <210> 125
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 125
 Pro Thr Gln Gly Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 60 1 5 10

<210> 126
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 10 <400> 126
 Pro Thr Gln Gly Pro Ala Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10

 <210> 127
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 20 <400> 127
 Pro Gln Gly Thr Pro Ala Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10

 <210> 128
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Secuencia de mutación FGF

 <4000> 128
 Pro Ala Thr Glu Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10

 35 <210> 129
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 129
 Pro Thr Thr Gln Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10

 45 <210> 130
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 130
 Pro Thr Thr Glu Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10

 55 <210> 131
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 131
 Pro Glu Arg Val Pro Thr Leu Tyr Lys Asp
 5 1 5 10

<210> 132
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

15 <400> 132
 Pro Glu Arg Val Pro Thr Leu Tyr Ala Asp
 1 5 10

<210> 133
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

25 <400> 133
 Pro Glu Arg Val Pro Thr Gln Gly Ala Asp
 1 5 10

<210> 134
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

35 <400> 134
 Pro Glu Arg Val Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro
 1 5 10

<210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

45 <400> 135
 Pro Glu Arg Val Pro Thr Gln Gly Ala
 1 5

<210> 136
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

55 <220>
 <221> característica miscelánea
 60 <223> X se selecciona entre OH, NH2, glicina, alanina, leucina y asparagina

- 5
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 136
 Leu Met Tyr Thr Pro Xaa
 1 5
- 10
 <210> 137
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 15
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
- 20
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> X se selecciona entre OH, NH2, glicina, alanina, leucina y asparagina
- 25
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 137
 Leu Thr Glu Thr Pro Xaa
 1 5
- 30
 <210> 138
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
- 40
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> X se selecciona entre OH, NH2, glicina, alanina, leucina y asparagina
- 45
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 138
 Val Thr Glu Thr Pro Xaa
 1 5
- 50
 <210> 139
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 55
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
- 60
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> X se selecciona entre OH, NH2, glicina, alanina, leucina y asparagina
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (8) .. (8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 139
 Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Xaa
 1 5

5 <210> 140
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> X se selecciona entre OH, NH2, glicina, alanina, leucina y asparagina

20 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (13) .. (13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 140
 Pro Glu Leu Tyr Val Gly Val Thr Cys Thr Pro Leu Xaa
 1 5 10

25 <210> 141
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

35 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> X se selecciona entre OH, NH2, glicina, alanina, leucina y asparagina

40 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (5) .. (5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 141
 Leu Met Tyr Thr Xaa
 1 5

45 <210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 142
 Leu Met Tyr Thr Pro Thr Ala Ser Pro
 1 5

55 <210> 143
 <211> 9
 <212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 143
~~Leu Met Tyr Thr Pro Ala Thr Glu Pro~~
1 5

5 <210> 144
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de mutación FGF

15 <220>
<221> característica miscelánea
<223> X se selecciona entre OH, NH2, glicina, alanina, leucina y asparagina

20 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (8) .. (8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 144
~~Leu Met Tyr Thr Pro Thr Pro Xaa~~
1 5

25 <210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia de mutación FGF

35 <220>
<221> característica miscelánea
<223> X se selecciona entre OH, NH2, glicina, alanina, leucina y asparagina

40 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (9) .. (9)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 145
~~Leu Met Tyr Thr Pro Thr Ala Pro Xaa~~
1 5

45 <210> 146
<211> 182
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

50 <400> 146

ES 2 566 670 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

5 <210> 147
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 147
 Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser
 1 5

15 <210> 148
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 148
 Pro Leu Leu Gln Phe
 1 5

<210> 149
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF
 <400> 149
 Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu
 1 5
 <210> 150
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF
 20 <400> 150
 Lys Pro Gly Val Ile Gln
 1 5
 <210> 151
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF
 30 <400> 151
 Arg Pro Asp Gly Ala Leu
 1 5
 <210> 152
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF
 40 <400> 152
 Ser Leu His Phe Asp Pro
 1 5
 45 <210> 153
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF
 <400> 153
 Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg
 1 5 10 15
 Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
 20 25 30
 55 <210> 154
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Motivo de mutación FGF

 <400> 154
 Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
 1 5

 10 <210> 155
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

 <400> 155
 Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
 1 5

 20 <210> 156
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

 <400> 156
 Leu Ser Met Val Gly Pro
 1 5

 30 <210> 157
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

 <400> 157
 Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 1 5 10

 45 <210> 158
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

 50 <400> 158
 Met His Pro
 1

 55 <210> 159
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 159
 Met His Pro Ile Pro
 1 5

5 <210> 160
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 160
 Pro Asp Ser Ser
 1

15 <210> 161
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 161
 Met Val Thr Pro
 1

25 <210> 162
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 162
 Met Gln Thr Pro
 1

35 <210> 163
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

45 <400> 163
 Met Ala Thr Pro
 1

50 <210> 164
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 164
 Met Ile Ala Thr Pro
 1 5

<210> 165
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 165
 Met Phe Pro Thr Pro
 1 5
 10
 <210> 166
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 166
 Met His Pro Thr Pro
 1 5
 20
 <210> 167
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 30
 <400> 167
 Met Ala Pro Thr Pro
 1 5

 <210> 168
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 40
 <400> 168
 Met Phe Pro Ser Pro
 1 5
 45
 <210> 169
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 169
 Met His Pro Ser Pro
 1 5
 55
 <210> 170
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 170
 Met Ala Pro Ser Pro
 1 5
 5
 <210> 171
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 171
 Met Ser Pro Thr Pro
 1 5
 15
 <210> 172
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 172
 Pro Thr Ser Ser
 1
 25
 <210> 173
 <211> 4
 <222> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 173
 Pro Thr Gln Ala
 1
 35
 <210> 174
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 174
 Pro Thr Ala Gln
 1
 45
 <210> 175
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 175
 Pro Thr Ile Glu
 1
 55
 60

<210> 176
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 176
 Pro Ser Ser Ser
 1

 <210> 177
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 177
 Pro Thr Thr Gln Phe
 1 5

 <210> 178
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 178
 Pro Thr Ile Asn Thr
 1 5

 <210> 179
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 179
 Pro Thr Gln Gly Ala
 1 5

 <210> 180
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 180
 Pro Thr Gln Gly Phe
 1 5

 <210> 181
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 180
 Pro Thr Gln Gly Phe
 1 5

 <210> 181
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 180
 Pro Thr Gln Gly Phe
 1 5

 <210> 181
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60

 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 181
 Pro Thr Thr Val Ser
 1 5
 5
 <210> 182
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 182
 Pro Thr Gln Ala Phe
 1 5
 15
 <210> 183
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 183
 Ala Asp Gln Ser Pro Thr Ser Leu Leu
 1 5
 25
 <210> 184
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 35
 <400> 184
 Ala Asp Gln Ser Pro Thr Thr Val Ser
 1 5
 40
 <210> 185
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 185
 Ala Asp Gln Ser Pro Thr Ile Asn Thr
 1 5
 50
 <210> 186
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 186
 Ala Asp Gln Ser Pro Thr Gln Ala Leu
 1 5
 60

<210> 187
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 187
 Ala Asp Gln Ser Pro Thr Gln Gly Ala
 10 1 5

 <210> 188
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 20 <400> 188
 Ala Asp Gln Ser Pro Thr Gln Ala Leu
 1 5

 <210> 189
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 30
 <400> 189
 Ala Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu
 1 5

 <210> 190
 35 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 190
 Ala Thr Glu Ser Pro Glu Ser Leu Leu
 1 5

 45 <210> 191
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 191
 Ala Thr Glu Thr Pro Glu Ser Leu Leu
 55 1 5

 <210> 192
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 192
 Val Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu
 1 5
 5
 <210> 193
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 193
 Val Thr Glu Thr Pro Glu Ser Leu Leu
 1 5
 15
 <210> 194
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 194
 Ala Thr Glu Ser Pro Ala Ser Leu Leu
 1 5
 25
 <210> 195
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 195
 Ser Pro Thr Val Ile Gln
 1 5
 35
 <210> 196
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 196
 Ala Pro Thr Val Ile Gln
 1 5
 50
 <210> 197
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 197
 Ser Pro Thr Thr Val Ser
 1 5
 60

<210> 198
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 10 <400> 198
 Ser Pro Thr Ile Asn Thr
 1 5

 <210> 199
 <211> 6
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 20 <400> 199
 Ser Pro Thr Gln Ala Gln
 1 5

 <210> 200
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 30 <400> 200
 Ser Pro Thr Gln Gly Ala
 1 5

 35 <210> 201
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 201
 Ser Pro Thr Val Ile Ala
 1 5

 45 <210> 202
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 202
 Ala Pro Thr Thr Val Ser
 55 1 5

 <210> 203
 <211> 6
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 203
 Ala Pro Thr Ile Asn Thr
 5 1 5

 <210> 204
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Motivo de mutación FGF

 15 <400> 204
 Ser Pro Thr Gly Ala Leu
 1 5

 <210> 205
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 25
 <400> 205
 Ala Pro Thr Gly Ala Leu
 1 5

 <210> 206
 <211> 6
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 206
 Ser Pro Thr Ile Asn Thr
 1 5

 40 <210> 207
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 207
 Ser Pro Thr Thr Val Ser
 50 1 5

 <210> 208
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <220>
 60 <400> 208

Ser Pro Thr Gln Ala Leu
 1 5

 <210> 209
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 10
 <400> 209
 Ala Pro Thr Gln Ala Leu
 1 5

 <210> 210
 15 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <210>
 20 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 210
 Ser Pro Thr Gln Gly Ala
 1 5

 25 <210> 211
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 211
 Ser Pro Thr Gln Gly Ala Met
 1 5
 35
 <210> 212
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 212
 Ser Leu Thr Phe Thr Pro
 45 1 5

 <210> 213
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 213
 Ser Leu Thr Glu Thr Pro
 55 1 5

 <210> 214
 <211> 6
 60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

5

<400> 214
 Ser Val Thr Glu Thr Pro
 1 5

<210> 215
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Motivo de mutación FGF

<400> 215
 Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro
 1 5

20 <210> 216
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Motivo de mutación FGF

<400> 216
 His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg
 1 5 10

30 <210> 217
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Motivo de mutación FGF

<400> 217
 Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

40 <210> 218
 <211> 10
 <212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Motivo de mutación FGF

50 <400> 218
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
 1 5 10

<210> 219
 <211> 10
 <212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Motivo de mutación FGF

60 <400> 219

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
 1 5 10
 <210> 220
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 10 <400> 220
 Ala Thr Gly Thr Pro Leu His Leu Pro
 1 5
 <210> 221
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 221
 Ala Thr Glu Thr Pro Leu His Leu Pro
 1 5
 25 <210> 222
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 222
 Val Thr Glu Thr Pro Leu His Leu Pro
 1 5
 35 <210> 223
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 223
 Val Thr Gly Leu Pro Leu His Leu Pro
 45 1 5
 <210> 224
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 55 <400> 224
 Ala Thr Gly Leu Pro Leu His Leu Pro
 1 5
 <210> 225
 <211> 9
 60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

5

<400> 225
 Ala His Gly Leu Pro Thr Gln Ala Pro
 1 5

<210> 226

10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 226
 Ala His Gly Leu Pro Thr Ala Gln Pro
 1 5

20 <210> 227
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 227
 Ala His Gly Leu Pro Thr Glu Ile Pro
 1 5

30

<210> 228
 <211> 9
 <212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

40 <400> 228
 Ala His Gly Leu Pro Thr Ser Ser Pro
 1 5

<210> 229
 <211> 9
 <212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

50 <400> 229
 Ala His Gly Leu Pro Thr Ala Leu Pro
 1 5

<210> 230
 <211> 9
 <212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 230
 Ala Ser Gly Leu Pro Thr Gln Ala Pro
 1 5

5 <210> 231
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 231
 Ala Ser Gly Leu Pro Thr Glu Ile Pro
 1 5

15 <210> 232
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 232
 His Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro His Arg
 1 5 10

25 <210> 233
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 233
 His Leu Pro Thr Ser Gly Glu Pro His Arg
 1 5 10

35 <210> 234
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

45 <400> 234
 His Leu Pro Gly Ser Thr Ala Pro His Arg
 1 5 10

50 <210> 235
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 235
 His Leu Pro Gly Asn Thr Ser Pro His Arg
 1 5 10

<210> 236

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 236
 His Leu Pro Gly Thr Glu Ser Pro His Arg
 1 5 10

10 <210> 237
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 237
 His Leu Pro Leu Thr Gln Thr Pro His Arg
 1 5 10

20 <210> 238
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

30 <400> 238
 His Leu Pro Gly Thr Gln Thr Pro His Arg
 1 5 10

<210> 239
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

40 <400> 239
 His Leu Pro Leu Thr Gln Thr Pro Ala Arg
 1 5 10

45 <210> 240
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 240
 His Leu Pro Thr Asn Ala Ser Pro His Arg
 1 5 10

55 <210> 241
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 241
 His Leu Pro Thr Gln Gly Ser Pro His Arg
 1 5 10

5 <210> 242
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 242
 His Leu Pro Val Thr Ser Gln Pro His Arg
 1 5 10

15 <210> 243
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

25 <400> 243
 His Leu Pro Thr Ile Asn Thr Pro His Arg
 1 5 10

<210> 244
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

35 <400> 244
 His Leu Pro Thr Ser Val Ser Pro His Arg
 1 5 10

<210> 245
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 45 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 245
 Lys Ser Pro Thr Ala Gln Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

50 <210> 246
 <217> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 246
 Lys Ser Pro Thr Ala Asp Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

<210> 247
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 10 <400> 247
 Ala Ser Pro Thr Ala Gln Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

 <210> 248
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 20 <400> 248
 Ser Ser Pro Thr Ala Asp Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

 <210> 249
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 249
 Lys Ser Pro Thr Ser Asp Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

 35 <210> 250
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 250
 Lys Ser Pro Thr Glu Ile Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

 45 <210> 251
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 251
 Lys Ser Pro Thr Glu Ile Pro Ala Pro Arg
 55 1 5 10

 <210> 252
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 252
 Lys Ser Pro Thr Glu Asp Pro Ala Pro Arg
 5 1 5 10

<210> 253
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

15 <400> 253
 Ala Ser Pro Thr Glu Asp Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

<210> 254
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

25 <400> 254
 Ser Ser Pro Thr Ala Asp Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

<210> 255
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

35 <400> 255
 Ser Ser Pro Thr Ala Gln Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

40 <210> 256
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 256
 Lys Ser Pro Thr Gln Ala Pro Ala Pro Arg
 50 1 5 10

<210> 257
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 257
 Ser Ser Pro Thr Gln Ala Pro Ala Pro Arg
 60 1 5 10

<210> 258
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 10 <400> 258
 Ala Ser Pro Thr Glu Ile Pro Ala Pro Arg
 1 5 10

 <210> 259
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 20 <400> 259
 Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Thr Pro Arg
 1 5 10

 25 <210> 260
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 260
 Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ser Pro Arg
 1 5 10

 35 <210> 261
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 261
 Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Thr Pro Ala
 45 1 5 10

 <210> 262
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 55 <400> 262
 Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Thr Pro Ser
 1 5 10

 <210> 263
 <211> 10
 60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

5

<400> 263
 Lys Ser Pro His Ser Asp Pro Thr Pro Ala
 1 5 10

<210> 264
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 264
 Lys Ser Pro His Ala Asp Pro Thr Pro Ser
 1 5 10

20 <210> 265
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 265
 Lys Ser Pro His Ala Asp Pro Thr Pro Ala
 1 5 10

30 <210> 266
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 266
 Arg Gly Pro Thr Ser Phe Leu Pro Leu Pro
 1 5 10

40 <210> 267
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 267
 Arg Gly Pro Thr Ser Gly Glu Pro Leu Pro
 1 5 10

50 <210> 268
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

60 <400> 268

Arg Gly Pro Gly Ser Thr Ala Pro Leu Pro
 1 5 10
 <210> 269
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 10 <400> 269
 Arg Gly Pro Ala Asn Thr Ser Pro Leu Pro
 1 5 10
 <210> 270
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 270
 Arg Gly Pro Ala Thr Glu Ser Pro Leu Pro
 1 5 10
 25 <210> 271
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 271
 Arg Gly Pro Ala Thr Gln Thr Pro Leu Pro
 1 5 10
 35 <210> 272
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 272
 Arg Gly Pro Ala Thr Gln Thr Pro Leu Pro
 45 1 5 10
 <210> 273
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 55 <400> 273
 Arg Gly Pro Leu Thr Gln Thr Pro Leu Pro
 1 5 10
 <210> 274
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 274
 Arg Gly Pro Thr Gln Phe Leu Pro Leu Pro
 1 5 10

 10 <210> 275
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 275
 Arg Gly Pro Thr Ser Phe Leu Pro Leu Pro
 1 5 10

 20 <210> 276
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 276
 Arg Gly Pro Val Thr Ser Gln Pro Leu Pro
 1 5 10

 30 <210> 277
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 40 <400> 277
 Ser Gly Pro Thr Ser Phe Leu Pro Leu Pro
 1 5 10

 <210> 278
 <211> 10
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 50 <400> 278
 Ala Gly Pro Thr Ser Gly Glu Pro Leu Pro
 1 5 10

 <210> 279
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 60 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 279
 Ser Gly Pro Thr Ser Ala Leu Pro Leu Pro
 1 5 10

5 <210> 280
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 280
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Thr Pro
 1 5 10

15 <210> 281
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 281
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Ser Pro
 1 5 10

25 <210> 282
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

35 <400> 282
 Arg Gly Pro Ala Ser Phe Leu Pro Thr Pro
 1 5 10

40 <210> 283
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 283
 Thr Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
 1 5

50 <210> 284
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 284
 Ser Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
 1 5

60 <210> 285

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 285
 Glu Pro Pro Thr Ile Leu Ala Pro Gln
 1 5

10 <210> 286
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 286
 Glu Pro Pro Thr Thr Leu Ala Pro Gln
 1 5

20 <210> 287
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

30 <400> 287
 Glu Pro Pro Thr Gln Leu Ala Pro Gln
 1 5

<210> 288
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

40 <400> 288
 Glu Pro Pro Thr Gln Gly Ala Pro Gln
 1 5

<210> 289
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

50 <400> 289
 Glu Pro Pro Thr Ser Gly Glu Pro Gln
 1 5

55 <210> 290
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 290
 Glu Pro Pro Gly Ser Thr Ala Pro Gln
 1 5

5 <210> 291
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 291
 Glu Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Gln
 1 5

15 <210> 292
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

25 <400> 292
 Glu Pro Pro Gly Asn Thr Ser Pro Gln
 1 5

30 <210> 293
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

40 <400> 293
 Glu Pro Pro Gly Thr Glu Ser Pro Gln
 1 5

45 <210> 294
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

50 <400> 294
 Glu Pro Pro Gly Thr Glu Thr Pro Gln
 1 5

55 <210> 295
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 295

1 Glu Pro Pro Val Thr Ser Gln Pro Gln
 1 5

5 <210> 296
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

15 <400> 296
 Glu Pro Pro Ala Val Gln Thr Pro Gln
 1 5

20 <210> 297
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

30 <400> 297
 Glu Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro Gln
 1 5

35 <210> 298
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

45 <400> 298
 Glu Pro Pro Val Thr Ser Gln Pro Gln
 1 5

50 <210> 299
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

60 <400> 300
 Glu Pro Pro Thr Ile Asn Thr Pro Gln
 1 5

60 <210> 301
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

5

<400> 301
 Glu Pro Pro Thr Thr Val Ser Pro Gln
 1 5

<210> 302

10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 302
 Glu Pro Pro Thr Gln Ala Ala Pro Gln
 1 5

20 <210> 303
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 303
 Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Thr
 1 5

30 <210> 304
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

<400> 304
 Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Ser
 1 5

40 <210> 305
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF

50 <400> 305
 Thr Val Gly Ser Ser Asp Pro
 1 5

<210> 306

55 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de mutación FGF

60 <400> 306

Asp Val Gly Ser Ser Thr Pro
 1 5
 <210> 307
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 10 <400> 307
 Asp Val Gly Thr Glu Thr Pro
 1 5
 <210> 308
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 308
 Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro
 1 5
 25 <210> 309
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 309
 Asp Ala Ala Thr Ala Ala Pro
 1 5
 35 <210> 310
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 310
 Asp Val Gly Thr Ser Asp Pro
 1 5
 45 <210> 311
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 55 <400> 311
 Asp Val Ala Thr Ser Asp Pro
 1 5
 <210> 312
 <211> 7
 60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 5 <400> 312
 Thr Gly Asp Ser Ser Asp Pro
 1 5
 <210> 313
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 313
 Thr Asp Ala Ser Gly Ala Pro
 1 5
 20 <210> 314
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 314
 Asp Val Gly Thr Ser Gly Pro
 1 5
 30 <210> 315
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 315
 Thr Ser Met Val Gly Pro
 40 1 5
 <210> 316
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 50 <400> 316
 Thr Ser Gly Val Gly Pro
 1 5
 <210> 317
 <211> 6
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 60

<400> 317
 Thr Ser Gly Ala Met Pro
 1 5

5 <210> 318
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 318
 Thr Gln Gly Ala Met Pro
 1 5

15 <210> 319
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 319
 Thr Ser Met Val Gly Pro
 1 5

25 <210> 320
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

<400> 320
 Thr Gln Gly Ala Met Pro
 1 5

35 <210> 321
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

45 <400> 321
 Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 1 5

<210> 322
 <211> 7
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

55 <400> 322
 Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 1 5

60 <210> 323
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 323
 Ser Gln Gly Ala Ser Pro
 1 5

 10 <210> 324
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 324
 Thr Gln Gly Ala Ser Pro
 20 1 5

 <210> 325
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 30 <400> 325
 Thr Gln Gly Ala Met Pro
 1 5

 <210> 326
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 40 <400> 326
 Thr Gln Gly Ala Met Pro
 1 5

 <210> 327
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 50 <400> 327
 Ala Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 1 5

 55 <210> 328
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 328
 Arg Ser Pro Thr Ser Ala Val Ala Ala
 1 5
 5
 <210> 329
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 329
 Ala Ser Pro Thr Ser Ala Val Ala Ala
 1 5
 15
 <210> 330
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 330
 Ala Ser Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 1 5 10
 25
 <210> 331
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 331
 Ala Ser Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 1 5
 35
 <210> 332
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 332
 Ala Ser Pro Ser Ser Gly Ala Pro
 1 5
 45
 <210> 333
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 333
 Arg Ser Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 1 5 10
 55
 60

<210> 334
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 334
 Ala Ser Pro Thr Ile Asn Thr
 1 5
 10
 <210> 335
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 335
 Ala Ser Pro Thr Ser Val Ser
 1 5
 20
 <210> 336
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 336
 Ala Ser Pro Thr Gln Ala Phe
 1 5
 30
 <210> 337
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 337
 Ala Ser Pro Thr Ile Asn Thr Pro
 1 5
 40
 <210> 338
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 338
 Met Ala Pro Thr Gln Ala Pro Leu Ala Glu Val
 1 5 10
 55
 <210> 339
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>

<223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 339
 Met Ala Pro Thr Glu Ile Pro Leu Ala Glu Val
 1 5 10
 5
 <210> 340
 <210> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 340
 Met Ala Pro Thr Ile Asn Thr Pro Leu Ala Glu Val
 1 5 10
 15
 <210> 341
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 341
 Met Ala Pro Thr Ile Asn Thr Leu Ala Glu Val
 1 5 10
 25
 <210> 342
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 342
 Met Ala Pro Thr Thr Val Ser Leu Ala Glu Val
 1 5 10
 35
 <210> 343
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 343
 Met Ala Pro Thr Gln Glu Val Leu Ala Glu Val
 1 5 10
 45
 <210> 344
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 <400> 344
 Met Ala Pro Thr Gln Ala Val Leu Ala Glu Val
 1 5 10
 55

<210> 345
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 10 <400> 345
 Pro Pro Thr Ile Asn Thr Pro Pro
 1 5

 <210> 346
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 20 <400> 346
 Pro Pro Thr Thr Val Ser Pro Pro
 1 5

 <210> 347
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 347
 Pro Pro Thr Gln Ala Leu Pro Pro
 1 5

 35 <210> 348
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 348
 Pro Pro Thr Ile Asn Thr Arg Arg Ser
 1 5

 45 <210> 349
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 349
 Pro Pro Thr Thr Val Ser Arg Arg Ser
 1 5

 55 <210> 350
 <211> 7
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 350
 5 Pro Thr Ile Asn Thr Leu Ala
 1 5

 <210> 351
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 15 <400> 351
 Pro Thr Thr Val Ser Leu Ala
 1 5

 <210> 352
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF
 25
 <400> 352
 Pro Thr Gln Ala Gln Leu Ala
 1 5

 <210> 353
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 353
 Pro Thr Ile Asn Thr Gln Gly Thr
 1 5

 40 <210> 354
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

 <400> 354
 Pro Thr Thr Val Ser Gln Gly Thr
 1 5
 50
 <210> 355
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia de mutación FGF

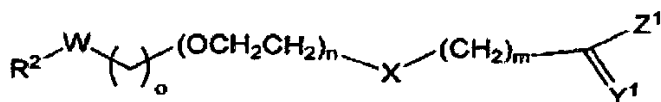
 <400> 355
 60 Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Thr Ile Asn Thr Arg Ser Lys Arg His

ES 2 566 670 T3

	1		5		10		15									
	<210> 356															
	<211> 16															
5	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
	<223> Secuencia de mutación FGF															
10	<400> 356															
	Leu	Asn	Lys	Asp	Gly	Thr	Pro	Thr	Ile	Asn	Thr	Ser	Ser	Lys	Arg	His
	1				5					10						15
	<210> 357															
15	<211> 16															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
20	<223> Secuencia de mutación FGF															
	<400> 357															
	Leu	Asn	Lys	Asp	Gly	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Ser	Arg	Ser	Lys	Arg	His
	1				5					10						15
25	<210> 358															
	<211> 16															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
30	<223> Secuencia de mutación FGF															
	<400> 358															
	Leu	Asn	Lys	Asp	Gly	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Ser	Ala	Ser	Lys	Arg	His
	1				5					10						15
35	<210> 359															
	<211> 10															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
40	<220>															
	<223> Secuencia de mutación FGF															
	<400> 359															
45	Pro	Thr	Gln	Ala	Pro	Glu	Leu	Tyr	Lys	Asp						
	1				5					10						
	<210> 360															
	<211> 10															
	<212> PRT															
50	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
	<223> Secuencia de mutación FGF															
55	<400> 360															
	Pro	Thr	Glu	Ile	Pro	Glu	Leu	Tyr	Lys	Asp						
	1				5					10						

REIVINDICACIONES

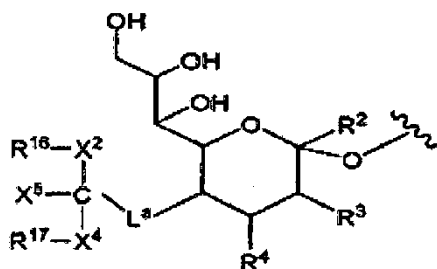
1. Un conjugado de Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) que comprende:
 un péptido FGF-21 mutante que comprende un sitio de glucosilación unido a N o unido O recién introducido que no
 existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente, donde el Factor de Crecimiento
 5 de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al
 menos 95 % con la SEQ ID NO: 146;
 y donde el sitio de glucosilación unido a N o unido O recién introducido tiene una separación inferior a 4 aminoácidos
 de un resto de prolina en el lado C o N terminal del resto de prolina, por ejemplo, el resto de prolina localizado en la
 posición 3, 5, 9, 50, 61, 79, 91, 116, 120, 125, 129, 134, 139, 151, 156, 166, 172 o 178 de SEQ ID NO: 146; y
 10 un grupo modificador, donde dicho grupo modificador está unido de manera covalente a dicho péptido en un resto de
 glucosilo o aminoácido preseleccionado de dicho péptido FGF-21 mutante mediante un grupo de unión de glucosilo
 intacto, concretamente un grupo de unión de glucosilo donde el monómero sacárido que une el grupo modificador
 con el resto de la molécula no está degradado.
2. El conjugado de FGF de la reivindicación 1, donde dicho péptido FGF-21 mutante comprende al menos una
 15 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-337.
3. El conjugado de FGF de cualquier reivindicación anterior, donde dicho grupo modificador está unido de manera
 covalente con dicho resto de glucosilo preseleccionado, opcionalmente dicho grupo modificador es un grupo
 modificador no glucosídico; opcionalmente dicho grupo modificador no glucosídico es un miembro seleccionado de
 PEG lineal y PEG ramificado; opcionalmente dicho PEG lineal tiene una estructura según la siguiente fórmula:



20 en la que

- R^2 es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo
 sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, por
 ejemplo, acetal, OHC-, $H_2N-CH_2CH_2-$, $HS-CH_2CH_2-$ y $-(CH_2)_qC(Y^1)Z^2$; -nucleótido de azúcar o proteína;
- 25 n es un número entero seleccionado de 1 a 2500;
- m, o y q son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 20;
- Z es un miembro seleccionado de OH, NH_2 , halógeno, $S-R^3$, la porción de alcohol de ésteres activados, -
 $(CH_2)_pC(Y^2)V$, $-(CH_2)_pU(CH_2)_sC(Y^2)_v$, nucleótido de azúcar, proteína y grupos salientes, por ejemplo, imidazol, p-
 nitrofenilo, HOBT, tetrazol, haluro;
- 30 X, Y^1 , Y^2 , W y U se seleccionan independientemente de O, S, $N-R^4$;
- V es un miembro seleccionado de OH, NH_2 , halógeno, $S-R^5$, el componente alcohol de ésteres activados, el
 componente amina de amidas activadas, nucleótidos de azúcar y proteínas;
- p, s y v son números enteros independientemente seleccionados de 0 a 20; y
- 35 R^3 , R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o
 sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin
 sustituir.

4. El conjugado de FGF de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho grupo de unión a glucosilo tiene una
 estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



en donde

R^2 es H, CH_2OR^7 , $COOR^7$ u OR^7

en donde

R^7 representa H, alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir;

5 R^3 y R^4 son miembros independientemente seleccionados de H, alquilo sustituido o sin sustituir, OR^8 , $NHC(O)R^9$

en donde

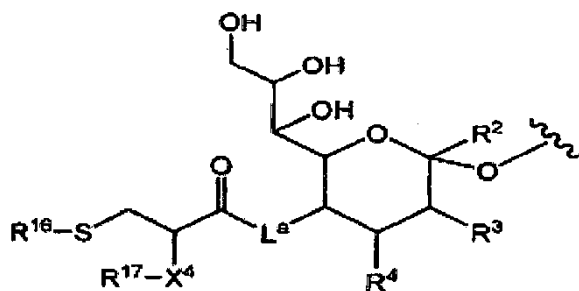
R^8 y R^9 se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir o ácido siálico;

10 L^a es un enlazador seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir

R^{16} y R^{17} son independientemente brazos poliméricos seleccionados;

X^2 y X^4 son independientemente fragmentos de unión seleccionados que se unen a residuos poliméricos R^{16} y R^{17} a C, y

15 X^5 es un grupo no reactivo; opcionalmente dicho grupo de unión a glucosilo tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



5. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante, donde el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende un sitio de glucosilación unido a N o unido a O recién introducido que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente, donde la secuencia de aminoácidos del Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene una homología de al menos 95 % con la SEQ ID NO: 146; y donde el sitio de glucosilación recién introducido tiene una separación inferior a 4 aminoácidos de un resto de prolina en el lado C o N terminal del resto de prolina, por ejemplo, el resto de prolina localizado en la posición 3, 5, 9, 50, 61, 79, 91, 116, 120, 125, 129, 134, 139, 151, 156, 166, 172 o 178 de la SEQ ID NO: 146.

20 6. El ácido nucleico de la reivindicación 5, donde el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-337, y/o donde el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido.

7. Un casete de expresión o una célula que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5 o 6.

30 8. Un Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante, que comprende un sitio de glucosilación unido a N o unido a O recién introducido que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % con la SEQ ID NO: 146; y donde el sitio de glucosilación recién introducido tiene una separación inferior a 4 aminoácidos de un resto de prolina en el lado C o N terminal del resto de prolina, por ejemplo, el resto de prolina se localizado en la posición 3, 5, 9, 50, 61, 79, 91, 116, 120, 125, 129, 134, 139, 151, 156, 166, 172 o 178 de la SEQ ID NO: 146.

35 9. El Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la reivindicación 8, donde dicho FGF-21 mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-337, y/o donde el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido.

40

10. El Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante de la reivindicación 8 o 9, que comprende un polímero soluble en agua unido a un sitio de glucosilación a través de un enlazador de glucosilo, siendo opcionalmente dicho enlazador de glucosilo un enlazador de glucosilo intacto.

5 11. Un procedimiento para producir un Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante, que comprende un sitio de glucosilación unido a N o unido a O recién introducido que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente, que comprende las etapas de:

- (a) producir de manera recombinante el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante; y
- (b) glucosilar el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante en el sitio de glucosilación recién introducido

10 donde

dicha glucosilación es un proceso acelular, *in vitro*,

15 donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % con la SEQ ID NO: 146 y donde el sitio de glucosilación recién introducido tiene una separación inferior a 4 aminoácidos de un resto de prolina en el lado C o N terminal del resto de prolina, por ejemplo, el resto de prolina localizado en la posición 3, 5, 9, 50, 61, 79, 91, 116, 120, 125, 129, 134, 139, 151, 156, 166, 172 o 178 de la SEQ ID NO: 146.

20 12. El procedimiento de la reivindicación 11, donde el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-337, y/o donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido.

13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 8 a 10.

14. Un producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 8 a 10 para el uso en el tratamiento de deficiencia del Factor de Crecimiento de Fibroblastos.

25 15. Un procedimiento para producir un glucoconjugado de un Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante, que comprende un sitio de glucosilación unido a N o unido a O recién introducido que no existe en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente, que comprende las etapas de:

- (a) producir de manera recombinante el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante; y
- (b) glucosilar enzimáticamente el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante con un azúcar modificado en el sitio de glucosilación recién introducido

30 donde

35 dicha glucosilación es un proceso acelular, *in vitro*, donde el Factor de Crecimiento de Fibroblastos de tipo silvestre correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146, y donde el sitio de glucosilación recién introducido tiene una separación inferior a 4 aminoácidos de un resto de prolina en el lado C o N terminal del resto de prolina, por ejemplo, el resto de prolina localizado en la posición 3, 5, 9, 50, 61, 79, 91, 116, 120, 125, 129, 134, 139, 151, 156, 166, 172 o 178 de SEQ ID NO: 146; y/o donde el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 161-214, 220-320 y 323-337 y/o el Factor-21 de Crecimiento de Fibroblastos mutante comprende más de un sitio de glucosilación recién introducido; opcionalmente el azúcar modificado se modifica con un polímero soluble en agua, 40 opcionalmente el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en poli(etilenglicol) y m-poli(etilenglicol).

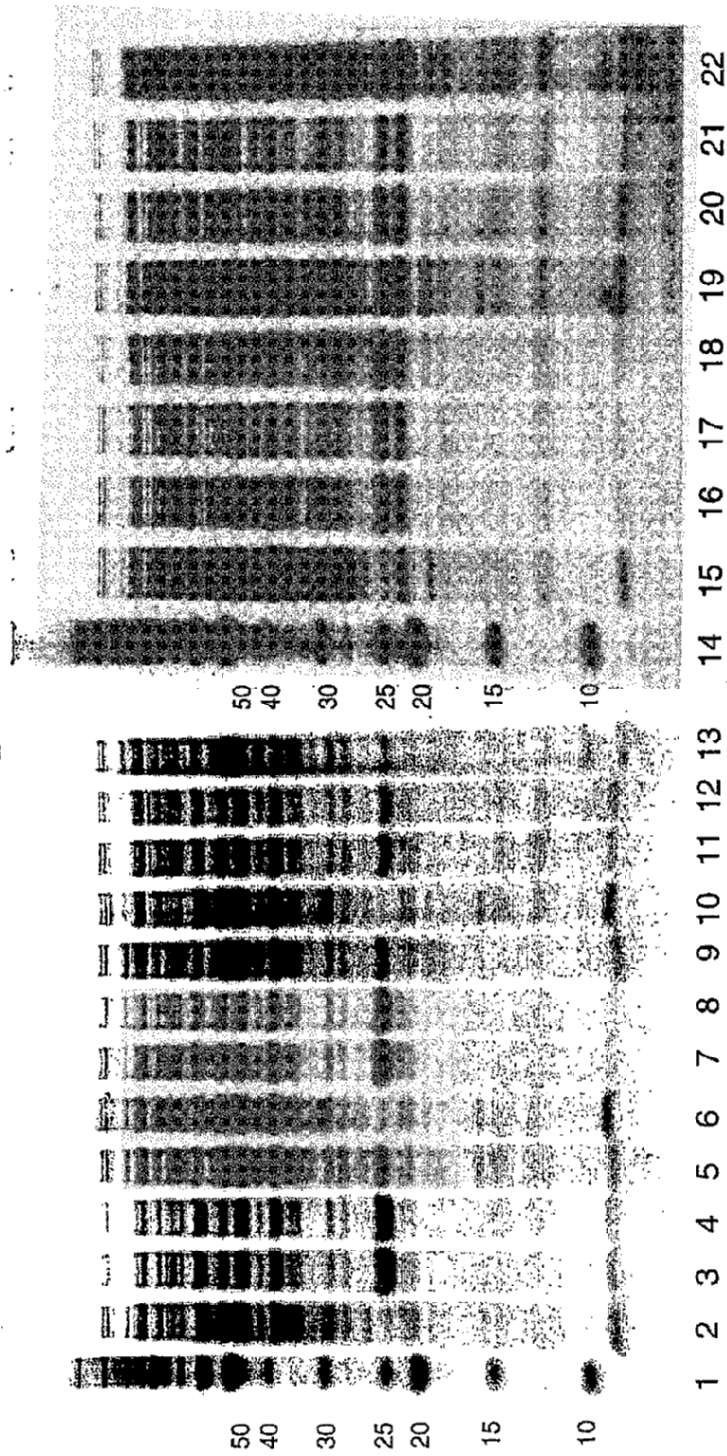
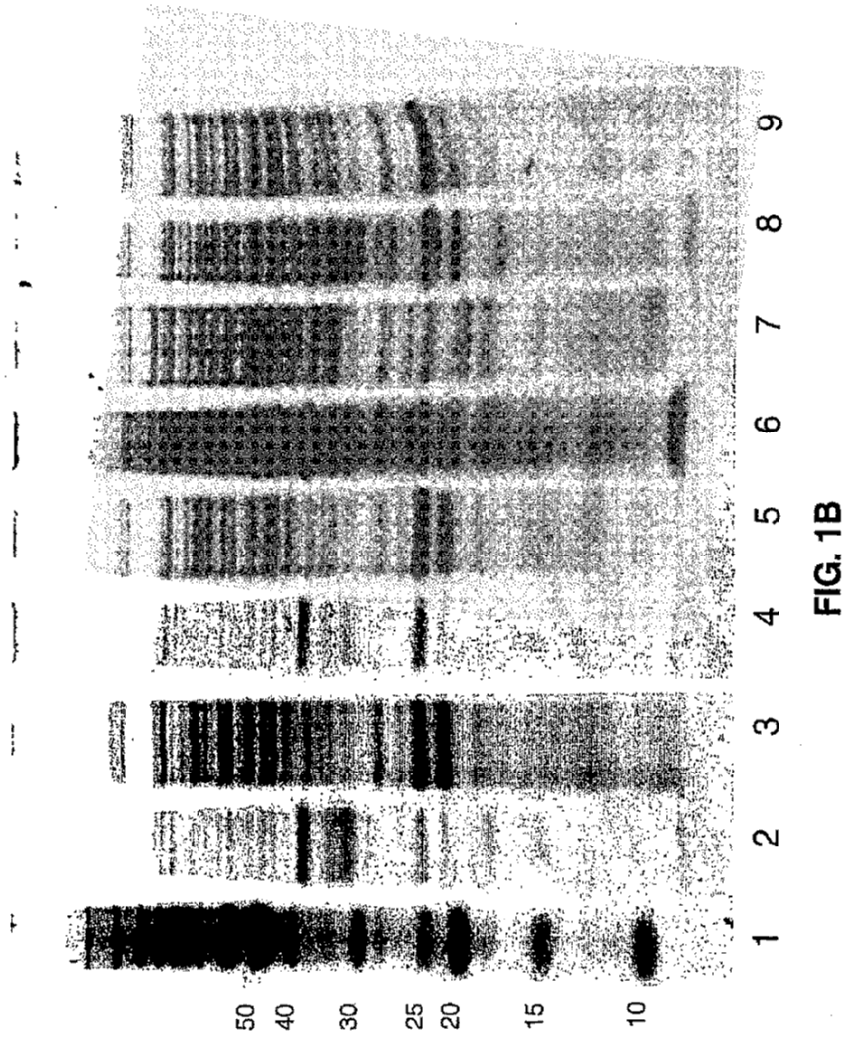


FIG. 1A



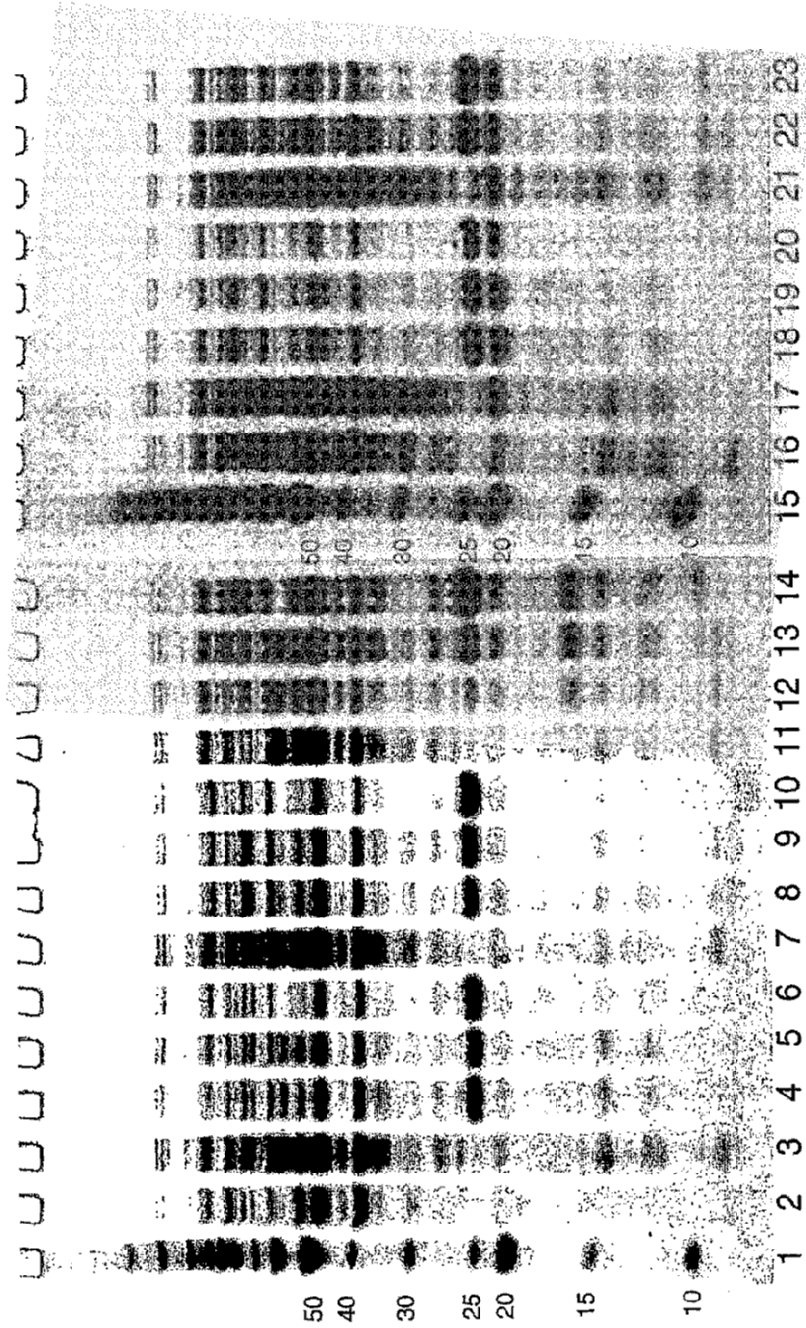


FIG. 1C

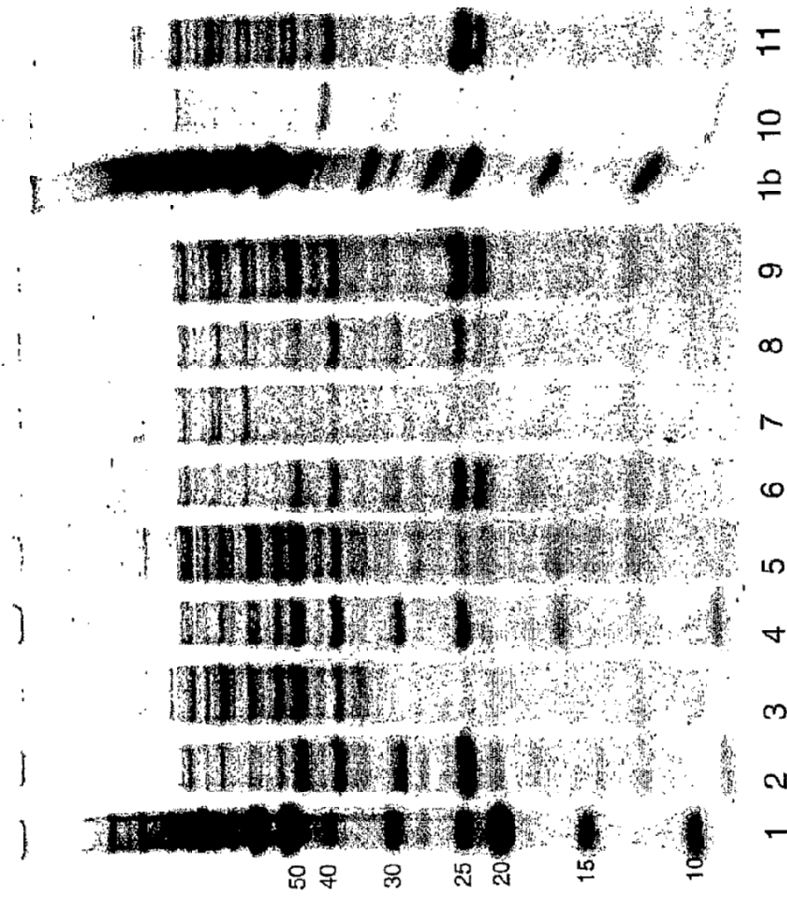


FIG. 1D

FIG. 2A

Proteina	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDZ /3D
Artg08280	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC011458 BT004583 NC_003070	AAF18241.1 AAQ42528.1 NP_172305.1	Q84W00 Q88GD2
Artg08860/F22O13.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC003881 AY084185 AY124807 NC_003070 KM_183809	AAF18778.1 AAL36042.1 AAM70619.1 NP_172342.1 NP_850940.1	Q8VZJ0 Q8FRR9
At3g48820/T21J18_90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AY080589 AY138818 AL132883	AAL88998.1 AAM81750.1 CAB87819.1	Q8FY00 Q9M501
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ584673	CAE48288.1	
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-V)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ585768	CAE51892.1	
α -2,6-sialiltransferasa (Siat7b)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ820851	CAF05880.1	
α -2,6-sialiltransferasa (SIAT8A)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.8	AJ889418	CAQ27889.1	
α -2,8-sialiltransferasa (Siat8D)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ699421	CAG27883.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia-III (Siat8C)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ704583	CAG28898.1	
CMP α -2,6-sialiltransferasa (ST8Gal I)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.1	Y15111 NML177517	CAA75385.1 NP_803483.1	Q18974
sialiltransferasa 8 (fragmento)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AF450088	AAL47018.1	Q8WN13
sialiltransferasa ST3Gal-II (Siat4B)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748841	CAG44450.1	
sialiltransferasa ST3Gal-III (Siat8)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748842	CAG44461.1	
sialiltransferasa ST3Gal-VI (Siat10)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748843	CAG44462.1	
ST3Gal I	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ305088	CAC24898.1	Q8BEG4
ST6GalNAc-VI	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ820949	CAF06586.1	
CO34	<i>Branchiostoma floridae</i>	n.d.	AF391289	AAM18878.1	Q8T771
polisialiltransferasa (PST) (fragmento) ST8Sia IV	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210729	AAF17105.1	Q8TT09
polisialiltransferasa (STX) (fragmento) ST8Sia II	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210918	AAF17104.1	Q8TT10
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona intestinalis</i>	n.d.	AJ826815	CAF25178.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona savignyi</i>	n.d.	AJ826814	CAF25172.1	
α -2,6-polysialyltransferasa ST8Sia IV	<i>Cricetulus griseus</i>	2.4.99.-	Z48801	AAE28834 CAA88822.1	Q64890
Gal 1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY288876	AAP22942.1	Q80WLD
Gal 1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (fragmento)	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY288878	AAP22943.1	Q80WK9
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783740	CAH04017.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783741	CAH04018.1	

FIG. 2B

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat3B)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ626821 CAF25178.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744809 CAG32845.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal V-r (Siat5-relacionada)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783742 CAH04018.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I (Siat1)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744801 CAG32857.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ634459 CAG25680.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646874 CAG26703.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646883 CAG26712.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ716535 CAG26374.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ716543 CAG26382.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia IV (Siat 8D) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ716545 CAG26384.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ716546 CAG26385.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ716551 CAG26390.1	
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ627827 CAF29485.1	
<i>N</i> -glucan α -2,6-sialiltransferasa	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC050483 AAH50483.1 Q7ZU51 AY055482 AAL17878.1 Q8QH83 NM 153662 NP 705948.1	
ST3Gal III-related (sial6r)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC053178 AAH53178.1 Q7T3B9 AJ626820 CAF25178.1 NM 200366 NP 858849.1	
ST3Gal-V	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ618880 CAF04061.1	
st6GalNAc-VI	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC060832 AAH60832.1 AJ620947 GAF06584.1	
α -2,6-sialiltransferasa (CG4871) ST6Gal I	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.4.99.1	AE003485 AAF47266.1 Q9GU23 AF218237 AAG13185.1 Q9W121 AF397632 AAK92126.1 AE003465 AAM70791.1 NM_079129 NP_523853.1 NM 168684 NP 728474.1	
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-VI)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585767 CAE51391.1 AJ627204 CAF25503.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.4	X80503 CAE56888.1 Q11200 NM 205217 NP 890548.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (fragment)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF035250 AAC14163.1 Q73724	
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-I)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585761 CAE51385.2	
α -2,6-sialiltransferasa (Siat7b)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ620653 CAF06852.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	X75558 CAA53235.1 Q92182 NM 205241 NP 890572.1	
α -2,6-sialiltransferasa	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.3	- AAE68028.1 Q92183	

FIG. 2C

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D	
ST6GalNAc I			X74948 NM_205240	AAE58029.1 CAA62302.1 NP_990571.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	X77716 NM_205233	AAE58030.1 CAA64813.1 NP_990584.1	Q92184
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (SIAT7C) (fragmento)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ834455	CAG22677.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (SIAT7E) (fragmento)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ846877	CAG26706.1	
α -2,6-sialiltransferasa (GDS sintasa) ST6Sia	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	U73176	AAC28888.1	P79783
α -2,6-sialiltransferasa (SIAT8B)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ898419	CAG27881.1	
α -2,6-sialiltransferasa (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ899420	CAG27882.1	
α -2,6-sialiltransferasa (SIAT8F)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ899424	CAG27888.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia-V (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ704684	CAG28697.1	
L-galactosamida α -2,6- sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ627829	CAF29497.1	
GM3 sintasa (SIAT9)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.9	AY615255	AA893519.1	
polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF008194	AAB95120.1	O42399
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	L29555 AF069321 L13972 AF165238 AF188181 BC018357 NM_003033 NM_173344	AAA36612.1 AAC17874.1 AAC37574.1 AAD39236.1 AAG29878.1 AAH18357.1 NP_003024.1 NP_775479.1	Q11201 Q60677 Q8UN51
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	U83080 BC038777 X85687 NM_008927	AAB40389.1 AAH36777.1 CAA85447.1 NP_008858.1	Q16842 O00854
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (SiaT6)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.6	L23768 BC050380 AF425851 AF425852 AF425853 AF425854 AF425855 AF425856 AF425857 AF425858 AF425859 AF425860 AF425861 AF425862 AF425863 AF425864 AF425865 AF425866 AF425867 AY167992 AY167993 AY167994	AAA35778.1 AAH50380.1 AAO13859.1 AAO13860.1 AAO13861.1 AAO13862.1 AAO13863.1 AAO13864.1 AAO13865.1 AAO13866.1 AAO13867.1 AAO13868.1 AAO13869.1 AAO13870.1 AAO13871.1 AAO13872.1 AAO13873.1 AAO13874.1 AAO13875.1 AAO38806.1 AAO38807.1 AAO38808.1	Q11203 Q86UR6 Q86UR7 Q86UR8 Q86UR9 Q86UR0 Q86US1 Q86US2 Q8IX43 Q8IX44 Q8IX45 Q8IX46 Q8IX47 Q8IX48 Q8IX49 Q8IX50 Q8IX51 Q8IX52 Q8IX53 Q8IX54 Q8IX55 Q8IX56

FIG. 2D

Proteina	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
			AY187885 AAO38800.1 AY187886 AAO38810.1 AY187887 AAO38811.1 AY187888 AAO38812.1 NM_006270 NP_066270.1 NM_174954 NP_777824.1 NM_174955 NP_777825.1 NM_174956 NP_777826.1 NM_174957 NP_777827.1 NM_174959 NP_777829.1 NM_174970 NP_777830.1 NM_174972 NP_777832.1	Q8IX57 Q8IX58
α -2,3-sialiltransferasa ST6Gal IV	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L23767 AAA16480.1 AF035246 AAO14162.1 BC010645 AAH10645.1 AY040626 AAK93780.1 AF516602 AAM66431.1 AF516603 AAM66432.1 AF516604 AAM66433.1 AF525084 AAM81378.1 X74570 CAA52662.1 CR456859 CAG33139.1 NM_006276 NP_006269.1	Q11206 Q60497 Q86QQ9 Q8N8A8 Q8N8A7 Q8NFD9 Q8NFG7
α -2,3-sialiltransferasa ST6Gal VI	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	AF119391 AAD39131.1 BC023312 AAH23312.1 AB022918 BAA77609.1 AX877828 CAE88895.1 AX888023 CAF00161.1 NM_006100 NP_006091.1	Q8Y274
α -2,6-sialiltransferasa (ST6Gal II ; KIAA1877)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC008680 AAH08680.1 AB058780 BAB47506.1 AB069565 BAC24793.1 AJ512141 CAD54408.1 AX795193 CAE48280.1 AX795193 CAE48281.1 NM_032626 NP_115917.1	Q86Y44 Q8IUG7 Q96HE4 Q96JF0
α -2,6-sialiltransferasa (ST6GALNAC III)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC059363 AAH59363.1 AY358540 AAQ88904.1 AK091215 BAC03611.1 AJ507291 CAD45371.1 NM_152896 NP_694541.1	Q8N259 Q8NDV1
α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc V)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC001201 AAH01201.1 AK056241 BAB71127.1 AL035409 CAB72344.1 AJ507282 CAD45372.1 NM_030935 NP_112227.1	Q9BVH7
α -2,6-sialiltransferasa (SThM) ST6GalNAc II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U14560 AAA52228.1 BC040455 AAH40455.1 AJ261053 CAB81434.1 NM_006458 NP_006447.1	Q8UJ37 Q12971
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.1	BC031476 AAH31476.1 BC040009 AAH40009.1 A17362 CAA01327.1 A23899 CAA01688.1 X17247 CAA35111.1 X54383 CAA38248.1 X82822 CAA44834.1 NM_003032 NP_003023.1 NM_173216 NP_776323.1	P15907
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.3	BC022482 AAH22482.1 AY096001 AAM22800.1 AY358918 AAQ89277.1 AK000113 BAA90953.1 Y11339 CAA72179.2	Q8TBJ6 Q8NSC7 Q8NXQ7

FIG. 2E

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
			NM_018414 NP_080884.1	
α -2,8-polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L41880 AAC41775.1 BC027888 AAH27888.1 BC053657 AAH53657.1 NM_005668 NP_005668.1	Q8N1F4 Q92187 Q92893
α -2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.8	L32867 AAH62388.1 L43494 AAC37889.1 BC046158 AAH46158.1 AAQ53140.1 AY569975 AAH75783.1 D26360 BAA05391.1 X77922 CAA54891.1 NM_003034 NP_003025.1	Q86X71 Q92185 Q93084
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L29556 AAH36613.1 U82782 AAB51242.1 U33551 AAC24456.1 BC068584 AAH68584.1 NM_006011 NP_006002.1	Q92186 Q92470 Q92746
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF004688 AAB57642.1 AF003082 AAC15901.2 NM_015879 NP_058993.1	Q49173 Q8NS41
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U81841 AAC51727.1 CF457037 CAG33318.1 NM_013305 NP_037437.1	Q15466
ENSP00000020221 (fragmento)		n.d.	AC023285	
lactosilceramida α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal V)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.8	AF105026 AAD14634.1 AF118415 AAF66146.1 BC065836 AAH46938.1 AY152815 AAC16866.1 AAP65068 AAP65068.1 AY359105 AAQ89463.1 AB018358 BAA33950.1 AX876538 CAE68320.1 NM_003898 NP_003867.2	Q9UNP4 Q94902
N-acetilgalactosaminida α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc VI)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	BC006584 AAH06584.1 BC007802 AAH07802.1 BC016299 AAH16299.1 AY358672 AAQ86035.1 AB035173 BAA87036.1 AK023900 BAB14715.1 AJ507293 CAD45373.1 AX880960 CAE91145.1 CF457318 CAG33599.1 NM_019443 NP_038471.2	Q869X2 Q9H8A2 Q9ULB8
N-acetilgalactosaminida α -2,6-sialiltransferasa IV (ST6GalNAc IV)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF127142 AAF00102.1 BC036705 AAH36705.1 AAP63349.1 AB035172 BAA87034.1 AK000800 BAA91281.1 Y17481 CAB44354.1 AJ271734 CAC07404.1 AX081820 CAC24981.1 AX088265 CAC27250.1 AX969252 CAF14360.1 NM_014403 NP_055216.3 NM_175039 NP_778204.1	Q8H4F1 Q9NWU8 Q9UKU1 Q9ULB9 Q9Y3G3 Q9Y3G4
ST8SIA-VI (fragmento)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AJ821589 CAP21722.1 XM_291725 XP_291725.2	
producto proteico desconocido	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AK021929 BAB13940.1 AX881888 CAE91353.1	Q9HAA9
Gal β -1,3/4-GlcNAc α -	<i>Mesocricetus</i>	2.4.99.6	AJ245888 CAB63394.1	Q8QXF6

FIG. 2F

Proteina	Organismo	N° EC	GenBank / GenPept	SwissProt	POB / 3D
2,3-sialiltransferasa (ST3Gal III)	<i>Sauratus</i>				
Gal ^I -1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal IV)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.8	AJ245700	CAB53995.1	Q6QXF6
GD3 sintasa (fragmento) (ST3Gal I)	<i>Mesocricetus auratus</i>	n.d.	AF141657	AAD33579.1	Q6WUL1
polisialiltransferasa (ST3Gal IV)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.-	AJ245701	CAB53996.1	Q6QXF4
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>St3gal1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF214028 AK031344 AK078469 X73523 NM_009177	AAF60973.1 BAC27356.1 BAC37280.1 CAA51919.1 NP_033203.1	P64761 Q11292 Q6JL30
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II	<i>St3gal2</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC016264 BC066064 AK034554 AK034883 AK063827 X76889 NM_009179 NM_178048	AAH15284.1 AAH66064.1 BAC28752.1 BAC28859.1 BAC35543.1 CAA54294.1 NP_033205.1 NP_836149.1	Q11204 Q6BPLO Q6BSA0 Q6BSE9 Q61WH6
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III	<i>St3gal3</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC006710 AK005053 AK013018 X84234 NM_009178	AAH06710.1 BAB23779.1 BAB28698.1 CAA59013.1 NP_033202.2	P67325 Q622X6 Q6CZ48 Q6DBB8
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV	<i>St3gal4</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC011121 BC050773 D28941 AK008543 AB081305 X85809 NM_009178	AAH11121.1 AAH50773.1 BAA09088.1 BAB25732.1 BAB47508.1 CAA65078.1 NP_033204.2	P67354 Q61326 Q61Y74 Q621R5 Q6CVE8
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI	<i>St3gal6</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF118380 BC052338 AB063328 AK033562 AK041173 NM_018784	AAD39130.1 AAH52338.1 BAB79494.1 BAC28360.1 BAC30651.1 NP_061254	Q60UR7 Q6BLV1 Q6VIB3 Q6WVG2
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II	<i>St6galnac2</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	NM_009180 BC010208 AB027198 AK004613 X93999 X94000 NM_009180	6677963 AAH10208.1 BAB00637.1 BAB23410.1 CAA63821.1 CAA63822.1 NP_033208.2	P70277 Q6DC24 Q6JJM5
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	<i>St6gal1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.1	BC027833 D16108 AK034768 AK084124 NM_145933	AAE68031.1 AAH27833.1 BAA03880.1 BAC28828.1 BAC39120.1 NP_668046.1	Q64885 Q6BM82 Q6K1L1
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal II	<i>St6gal2</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	AK082566 AB095083 AK129482 NM_172829	BAC38534.1 BAC87752.1 BAC98272.1 NP_768417.1	Q6BUU4
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I	<i>St6galnac1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.3	Y11274 NM_011371	CAA72197.1 NP_035501.1	Q6QZ39 Q6JJP5
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III	<i>St6galnac3</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	BC058387 AK034804 Y11342 Y11343	AAH58387.1 BAC28838.1 CAA72181.2 CAB95031.1	Q6WUV2 Q6JHP5

FIG. 2G

Proteina	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
			NM_011372 NP_035502		
α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc IV)	St6galnac4 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.7	BC058451 AK088730 AJ007310 Y15779 Y15780 Y19059 Y16057 NM_011373	AAH58451.1 BAC39523.1 CAA07448.1 CAB43607.1 GAB43514.1 CAB39846.1 CAB33548.1 NP_035503.1	Q8C9J2 Q8JHP2 Q9R2B6 Q88725 Q8JHP0 Q8QUP8 Q9R2B5
α -2,6-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST6Sia I	St6sia1 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	L38677 BC024821 AK048188 AK052444 DC84235 AJ401102 NM_011374	AAH91889.1 AAH24821.1 BAC32825.1 BAC34994.1 CAA59014.1 CAC20708.1 NP_035504.1	Q84468 Q84887 Q8BL76 Q8BW10 Q8K1C1 Q8EPK0
α -2,6-sialiltransferasa (ST6Sia VI)	St6sia6 <i>Mus musculus</i>	n.d.	AB059554 AK085105 NM_145838	BAC01285.1 BAC39867.1 NP_685837.1	Q8BI43 Q8K4T1
α -2,8-sialiltransferasa ST6Sia II	St6sia2 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	X89562 X99848 X99847 X99848 X99849 X99850 X99851 NM_009181	CAA58548.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 NP_083207.1	Q35898
α -2,8-sialiltransferasa ST6Sia IV	St6sia4 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC060112 AK003690 AK041723 AJ223958 X88000 Y08484 NM_009183	AAH60112.1 BAB22941.1 BAC31044.1 CAA11688.1 CAA59992.1 CAA70892.1 NP_033209.1	Q84682 Q8BY70
α -2,8-sialiltransferasa ST6Sia V	St6sia5 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC034855 AK078670 X98014 X98014 X98014 NM_013868 NM_153124 NM_177418	AAH34855.1 BAC37354.1 CAA86642.1 CAA86643.1 CAA86644.1 NP_038894.1 NP_694784.1 NP_803135.1	P70128 P70127 P70128 Q8BJW0 Q8JZQ3
α -2,8-sialiltransferasa ST6Sia III	St6sia3 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC075845 AK015874 X80502 NM_009182	AAH75645.1 BAB30012.1 CAA56865.1 NP_033208.1	Q84689 Q8CUJ8
GD1 sintasa (ST6GalNAc V)	St6galnac5 <i>Mus musculus</i>	n.d.	BC065737 AB030838 AB026840 AK034387 AK038434 AK042883 NM_012028	AAH65737.1 BAA85747.1 BAA89292.1 BAC28693.1 BAC29997.1 BAC31331.1 NP_036158.2	Q8CAM7 Q8CBX1 Q9QYJ1 Q8ROK8
GM3 synthase (α -2,3-sialiltransferasa) ST3Gal V	St3gal5 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.9	AF118416 AB018048 AB013302 AK012981 Y16003 NM_011375	AAF66147.1 AAP65083.1 BAA33491.1 BAA76467.1 BAB26571.1 CAA75235.1 NP_035505.1	Q88829 Q9CZ86 Q8QWF9
N-acetilgalactosaminida α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc VI)	St6galnac6 <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC038985 AB035174 AB035123 AK030848	AAH38985.1 BAA87038.1 BAA95940.1 BAC27084.1	Q8CDC3 Q8JZW3 Q8JM96 Q9R0G9

FIG. 2H

Proteina	Organismo	N° EC	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
			MM_018873/NP_058868.1	
M138L	<i>Myxoma virus</i>	n.d.	U48578 AF170728 NC_001132	AAD00958.1 AAE81323.1 AAE81326.1 AAP18882.1 NP_051852.1
α -2,3-sialiltransferasa (S13Gal-I)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ585780	CAE51394.1
α -2,6-sialiltransferasa (S1at1)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ620649	CAF05848.1
α -2,8-polisialiltransferasa IV (ST6Sia IV)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB084402	BAC77411.1 Q7T2X5
GalNAc α -2,6-sialiltransferasa (R1ST6GalNAc)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB097843	BAC77620.1 Q7T2X4
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2.4.99.-	AF121967	AAF26871.1 Q9N257
QJ1217_F02.7	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	n.d.	AF004084	BAD07616.1
OSJNBa0043L24.2 or OSJNBb0002J11.9	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	n.d.	AL731626 AL862989	CAD41185.1 CAE04714.1
P0883F02.16 or P0489B03.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	n.d.	AF003289 AF003794	BAB63716.1 BAB90552.1
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (S1at7E) (fragmento)	<i>Oryzias latipes</i>	n.d.	AJ848878	CAG26705.1
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (S1at4)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744803	CAG32839.1
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (S1at5)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744804	CAG32840.1
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (S1at6)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ826819	CAF25177.1
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (S1at4c)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ826824	CAF25182.1
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI (S1at10)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744808	CAG32844.1
α -2,6-sialiltransferasa (S1a7A)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748740	CAG38616.1
α -2,6-sialiltransferasa (S1a7B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748741	CAG38616.1
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (S1at7C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ834464	CAG26876.1
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (S1at7D) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ846870	CAG26889.1
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (S1at7E)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ846875	CAG26704.1
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (S1at7F) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ846882	CAG26711.1
α -2,8-sialiltransferasa 8A (S1a8A)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.8	AJ897658	CAG26896.1
α -2,8-sialiltransferasa 8B (S1a8B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ897659	CAG26897.1
α -2,8-sialiltransferasa 8C (S1a8C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ897680	CAG26898.1
α -2,8-sialiltransferasa 8D (S1a8D)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ897681	CAG26899.1
α -2,8-sialiltransferasa	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ897682	CAG26900.1

FIG. 2I

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
6E (Siat6E)				
α-2,8-sialiltransferasa 8F (Siat8F)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697663 CAG28901.1	
β-galactosamida α-2,6-sialiltransferasa I (ST6Gal I; Siat1)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.1	AJ627624 CAF28492.1	
β-galactosamida α-2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ627626 CAF28493.1	
GM3 sintasa ST3Gal V (Siat9)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744807 CAG32848.1	
S138L	<i>Rabbit fibroma virus Kasza</i>	n.d.	NC_001268 NP_052025	
α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.6	M87754 AAA42148.1 NM_031697 NP_113885.1	Q02734
α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626825 CAF25183.1	
α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626743 CAF25059.1	
α-2,6-sialiltransferasa ST3Gal II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	X76988 CAA54293.1 NM_031695 NP_113883.1	Q11206
α-2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.1	M18789 AAA41186.1 M83143 AAB07233.1	P13721
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I (Siat7A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634458 CAG25664.1	
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634457 CAG25679.1	
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L29554 AAC42088.1 BC072601 AAH72501.1 NM_019123 NP_081998.1	Q64686
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646871 CAG26700.1	
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646872 CAG26701.1	
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646881 CAG26710.1	
α-2,6-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U59883 AAC27641.1 D46255 BAA08213.1	P70554 P97713
α-2,8-sialiltransferasa (SIAT8E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699422 CAG27884.1	
α-2,8-sialiltransferasa (SIAT8F)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699423 CAG27885.1	
α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L13445 AAA42147.1 NM_057168 NP_476497.1	Q07977 Q64688
α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U59938 AAB50061.1 NM_013029 NP_037161.1	P97877
α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U80215 AAB49989.1	Q88563
β-galactosamida α-2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ627628 CAF28494.1	
GM3 sintasa ST3Gal V	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AB018048 BAAS3492.1 NM_031337 NP_112627.1	Q88630

FIG. 2J

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank/ GenPept	SwissProt (PDB /3D)
sialiltransferasa ST3Gal-I (Siat4A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ748840 CAG44449.1	
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-II)	<i>Sturana tropicalis</i>	n.d.	AJ585783 CAE51387.1	
α -2,6-sialiltransferasa (Siat7b)	<i>Sturana tropicalis</i>	n.d.	AJ620850 CAF08848.1	
α -2,6-sialiltransferasa (ST6Galnac)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	n.d.	AJ698425 CAG37887.1	
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-III)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ585785 CAE51388.1	
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-IV)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ684874 CAE48299.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.4	M97753 AAA31125.1	Q02745
α -2,6-sialiltransferasa (fragmento) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.1	AF136748 AAD33088.1	Q9X8G8
N-galactosamida α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc-V)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620848 CAF06585.2	
sialiltransferasa (fragmento) ST6Gal I	<i>sus scrofa</i>	n.d.	AF041031 AAC16838.1	Q82717
ST6GALNAC-V	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620848 CAF06585.1	
α -2,3-sialiltransferasa (Siat5-r)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744805 CAG32841.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ628818 CAF25174.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ628817 CAF25175.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ628818 CAF25176.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I (Siat7)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744800 CAG32838.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ834460 CAG26681.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II B (Siat7B-relacionada)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ834461 CAG26682.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (Siat7C) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634456 CAG26678.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	2.4.99.3	Y17486 AJ848859 CAB44338.1 CAG26698.1	Q9W6U8
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ648873 CAQ26702.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ848880 CAG26709.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715534 CAG29373.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8B) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715538 CAG29377.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715541 CAG29380.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia IIIr (Siat 8Cr)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715542 CAG29381.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715547 CAG29388.1	

FIG. 2K

Proteina	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
(fragmento)					
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento)	<i>Taifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715549 CAG28368.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia Vir (Siat 8F1)	<i>Taifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715550 CAG28369.1		
α -2,3-sialiltransferasa (Siat 5-r)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744808 CAG32842.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat 4)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744802 CAG32838.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat 6)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ626822 CAF25180.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat 7B)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ634482 CAG25883.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat 7E) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ646879 CAG28708.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715536 CAG28375.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8B) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715537 CAG28376.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715539 CAG28378.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IIIr (Siat 8Cr) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715540 CAG28379.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715548 CAG28387.1		
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-II)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585762 CAE51386.1		
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-VI)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585768 CAE51390.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal-III (Siat 6)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585784 CAE51388.1 AJ628823 CAF25181.1		
α -2,8-polisialiltransferasa	<i>Xenopus laevis</i>	2.4.99.	AB007468 BAA32617.1	O93234	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia-I (Siat 8A; GD3 sintasa)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AY272056 AAQ16162.1 AY272057 AAQ16183.1 AJ704562 CAG28885.1		
Desconocido (proteina para MGC: 81205)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	BC088760 AAH88760.1		
α -2,3-sialiltransferasa (3Gal-VI)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ626744 CAF25054.1		
α -2,3-sialiltransferasa (Siat 4c)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ622908 CAF22056.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat 7E) (fragmento)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ646878 CAG26707.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ715544 CAG28383.1		
L-galactosamida α -2,8-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ627828 CAF28488.1		
sialiltransferasa ST8SiaI	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AY652776 AAT67042		
poly- α -2,8-sialosil sialiltransferasa (NeuS) polisialiltransferasa	<i>Escherichia coli K1</i>	2.4.-.	M76370 AAA24213.1 X60598 CAA43053.1	Q57269	
	<i>Escherichia coli K92</i>	2.4.-.	M88479 AAA24216.1	Q47404	

FIG. 2L

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
α -2,8 polisialiltransferasa SiaD	<i>Neisseria meningitidis</i> B1940	2.4.-.-	M85053 X78088	AAA20478.1 CAA54985.1	Q51281 Q61146
SynE	<i>Neisseria meningitidis</i> FAM18	n.d.	U75850	AAB53842.1	O06435
polisialiltransferasa (SiaD) (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M1019	n.d.	AY234182	AAO85289.1	
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M209	n.d.	AY281046	AAP34788.1	
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3045	n.d.	AY281044	AAP34787.1	
polisialiltransferasa (SiaD) (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3915	n.d.	AY234191	AAO85289.1	
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3515	n.d.	AY281047	AAP34770.1	
polisialiltransferasa (SiaD) (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4211	n.d.	AY234190	AAO85288.1	
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4842	n.d.	AY281048	AAP34771.1	
polisialiltransferasa (SiaD) (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M5177	n.d.	AY234193	AAO85289.1	
SiaD	<i>Neisseria meningitidis</i> M5179	n.d.	AY281043	AAP34766.1	
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M880	n.d.	AY281045	AAP34768.1	
NMB0067	<i>Neisseria meningitidis</i> MCS8	n.d.	NC_003112	NP_273131	
Lst	<i>Aeromonas punctata</i> Sch3	n.d.	AF126258	AA966824.1	
ORF2	<i>Haemophilus influenzae</i> A2	n.d.	M94855	AAA24979.1	
HI1699	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	n.d.	U32842 NC_000807	AAC23345.1 NP_439841.1	Q48211
α -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> F82	2.4.99.4	U60684	AAC44539.1 AAE87205.1	P72074
α -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria meningitidis</i> 126E, NRCC 4010	2.4.99.4	U60682	AAC44544.2	
α -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria meningitidis</i> 408Y, NRCC 4030	2.4.99.4	U60681	AAC44543.1	
α -2,3-sialiltransferasa (NMB0922)	<i>Neisseria meningitidis</i> MCS8	2.4.99.4	U60680 AE002443 NC_003112	AAC44541.1 AAF41330.1 NP_273982.1	P72097
NMA1118	<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	n.d.	AL182765 NC_003116	CAB84380.1 NP_283887.1	Q8JUV6
PM0508	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d.	AE008088 NC_002883	AAK02592.1 NP_245445.1	Q9CNC4
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB25	n.d.	AF519787	AAM82550.1	Q8KS93
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB3	n.d.	AF519788	AAM82551.1	Q8KS92
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB39	n.d.	AF519789	AAM82552.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB53	n.d.	AF519790	AAM82553.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB57	n.d.	AF519791	AAM82554.1	Q8KS91
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB71	n.d.	AF519793	AAM82556.1	Q8KS89
WaaH	<i>Salmonella enterica</i>	n.d.	AF519792	AAM82556.1	Q8KS90

FIG. 2M

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDZ / 3D
	SAR85				
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC10V	n.d.	AF519779	AAM88840.1	Q8KS99
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC12	n.d.	AF519781	AAM88842.1	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC13I	n.d.	AF519782	AAM88843.1	Q8KS98
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC14I	n.d.	AF519783	AAM88844.1	Q8K897
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC16II	n.d.	AF519784	AAM88845.1	Q8K898
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC16II	n.d.	AF519785	AAM88846.1	Q8KS95
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC3I	n.d.	AF519772	AAM88834.1	Q8KSA4
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC4I	n.d.	AF519773	AAM88835.1	Q8KSA3
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC5IIa	n.d.	AF519774	AAM88836.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC5IIa	n.d.	AF519775	AAM88837.1	Q8KSA2
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC6	n.d.	AF519777	AAM88838.1	Q8KSA1
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC9V	n.d.	AF519778	AAM88839.1	Q8KSA0
UDP-glucosa : α -1,2-glucosiltransferasa (WaaH)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> SARC 5	2.4.1.-	AF511116	AAM48168.1	
bifuncional α -2,3/-2,8-sialiltransferasa (Cat-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43449	n.d.	AF401529	AAL06004.1	Q83CZ6
Cat	<i>Campylobacter jejuni</i> 81-178	n.d.	AF305571	AAL09368.1	
α -2,3-sialiltransferasa (Cat-III)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43429	2.4.99.-	AY044158	AAK73183.1	
α -2,3-sialiltransferasa (Cat-III)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43430	2.4.99.-	AF400047	AAK85418.1	
α -2,3-sialiltransferasa (Cat-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43432	2.4.99.-	AF215659	AAG43979.1	Q8FOM9
α -2,3/8-sialiltransferasa (CatII)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43435	n.d.	AF400048	AAK91725.1	Q83MQ0
α -2,3-sialiltransferasa cat-II	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43448	2.4.99.-	AF167344	AAF34137.1	
α -2,3-sialiltransferasa (Cat-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43458	2.4.99.-	AF401528	AAL05990.1	Q83D06
α -2,3/- α -2,8-sialiltransferasa (CatII)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43460	2.4.99.-	AY044868	AAK96001.1	Q838X6
α -2,3/8-sialiltransferasa (Cat-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700297	n.d.	AF216847	AAL38462.1	
ORF	<i>Campylobacter jejuni</i> GB11	n.d.	AY422197	AAR82875.1	
α -2,3-sialiltransferasa catIII	<i>Campylobacter jejuni</i> MSC57360	2.4.99.-	AF195055	AAG26922.1	
α -2,3-sialiltransferasa catIII C1140	<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	2.4.99.-	AL139077 NC_002163	CAB73395.1 NP_282288.1	Q9PNF4
α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (catIII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:10	n.d.	AX934427	AAO98889.1 CAF04167.1	
α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (CatII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:19	n.d.	AX934431	CAF04169.1	
α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (CatII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:36	n.d.	AX934438	CAF04171.1	
α -2,3/ α -2,8-	<i>Campylobacter</i>	n.d.	AX934434	CAF04170.1	

FIG. 2N

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
sialiltransferasa II (CstII)	<i>Jejuni O:4</i>				
α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni O:41</i>	n.d.	AA098870.1 AAT17967.1 AX934429 CAF04188.1		
α -2,3-sialiltransferasa cat-I	<i>Campylobacter jejuni OH4384</i>	2.4.99.-	AF130486 AAS38281.1	Q9RGF1	
bifuncional α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni OH4384</i>	2.4.99.-	AF130984 AX934425 AAFS1771.1 CAF04188.1	1R07 1R08	C A
H10352 (fragmento)	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	n.d.	U52720 X57315 NC 000907 AAC22015.1 CAA40567.1 NP_438518.1	P24324	
PM1174	<i>Pasteurella multocida PM70</i>	n.d.	AED06167 NC 002863 AAK03258.1 NP_248111.1	Q9CLP3	
Secuencia 10 de la patente US 6503744	Desconocido	n.d.	AA098872.1		
Secuencia 10 de la patente US 6899705	Desconocido	n.d.	AAT17969.1		
Secuencia 12 de la patente US 6899705	Desconocido	n.d.	AAT17970.1		
Secuencia 2 de la patente US 6709834	Desconocido	n.d.	AAT23232.1		
Secuencia 3 de la patente US 6503744	Desconocido	n.d.	AA098868.1		
Secuencia 3 de la patente US 6899705	Desconocido	n.d.	AAT17965.1		
Secuencia 34 de la patente US 6503744	Desconocido	n.d.	AA098884.1		
Secuencia 35 de la patente US 6503744 (fragmento)	Desconocido	n.d.	AA098885.1 AAS38282.1		
Secuencia 48 de la patente US 6899705	Desconocido	n.d.	AAT17988.1		
Secuencia 6 de la patente US 6899705	Desconocido	n.d.	AAT17966.1		
Secuencia 9 de la patente US 6503744	Desconocido	n.d.	AA098871.1		