



(12) **Oversettelse av  
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2068909 B1**

(19) NO

**NORGE**

(51) Int Cl.

**A61K 38/18 (2006.01)**

**A61K 47/48 (2006.01)**

**C07K 14/50 (2006.01)**

**C12N 1/21 (2006.01)**

**C12N 5/10 (2006.01)**

**C12N 15/18 (2006.01)**

**C12N 15/63 (2006.01)**

## Patentstyret

---

- (21) Oversettelse publisert 2012.08.27
- (80) Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet 2012.04.25
- (86) Europeisk søknadsnr 08732507.2
- (86) Europeisk innleveringsdag 2008.03.19
- (87) Den europeiske søknadens Publiseringsdato 2009.06.17
- (30) Prioritet 2007.03.30, US 921297 P  
2007.11.14, US 988060 P
- (84) Utpekte stater AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
- Utpekte samarbeidende stater AL BA MK RS
- (73) Innehaver Ambrx, Inc., 10975 North Torrey Pines Road, Suite 100, La Jolla CA 92037, USA
- (72) Oppfinner CUJEC, Thomas, P., 10988 Glencreek Circle, San Diego, CA 92131, USA  
MARIANI, Roberto, 350 W. Ash Street 1208, San Diego, CA 92101, USA  
HAYS PUTNAM, Anna-maria, A., 11522 Cesped Drive, San Diego, CA 92124, USA  
KEEFE, William, M., 1425 N. Crescent Heights Boulevard, 205, West Hollywood, CA 90046, USA  
KNUDSEN, Nick, 10709 Matinal Circle, San Diego, CA 92127, USA  
HO, Lillian, 6232 Canyon Bluff Court, San Diego, CA 92121, USA  
PINKSTAFF, Jason, 2095 Wandering Road, Encinitas, CA 92024, USA  
KRAYNOV, Vadim, 5457 White Oak Lane, San Diego, CA 92130, USA
- (74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118, OSLO, NO
- 

(54) **Benevnelse Modifiserte FGF-21 polypeptider og deres anvendelser**

- (56) **Anførte publikasjoner** US-A1- 2006 194 256 B1, US-B2- 7 259 248 B1, WO-A2-01/18172 B1, WO-A2-01/36640 B1, WO-A2-2005/074546 B1, WO-A2-2005/091944 B1, WO-A2-2006/050247 B1, KHARITONENKOV A ET AL: "FGF-21 as a novel metabolic regulator" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 115, no. 6, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 1627-1635, XP002362553 ISSN: 0021-9738, KHARITONENKOV ALEXEI ET AL: "THE METABOLIC STATE OF DIABETIC MONKEYS IS REGULATED BY FIBROBLAST GROWTH FACTOR-21" ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 148, no. 2, 1 February 2007 (2007-02-01), pages 774-781, XP009078947 ISSN: 0013-7227, MOYERS JULIE S ET AL: "Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling." JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY JAN 2007, vol. 210, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 1-6, XP002560527 ISSN: 0021-9541, NISHIMURA T ET AL: "IDENTIFICATION OF A NOVEL FGF, FGF-21, PREFERENTIALLY EXPRESSED IN THE LIVER" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, ELSEVIER, NL, vol. 1492, no. 1, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 203-206, XP000979068 ISSN: 0006-3002

## MODIFISERTE FGF-21 POLYPEPTIDER OG DERES ANVENDELSER

### Beskrivelse

### KRYSS-REFERANSE TIL BESLEKTEDE SØKNADER

Denne søknaden krever prioritet og fordel fra U.S. provisorisk patentsøknad med løpenr. 60/921,297, levert 30. mars, 2007 og U.S. provisorisk patentsøknad med løpenr. 60/988,060, levert 14. november, 2007.

### OPPFINNELSENS OMRÅDE

Denne oppfinnelsen omhandler FGF-21 polypeptider valgfritt modifisert med minst én ikke-naturlig-kodet aminosyre.

### 10 BAKGRUNN FOR OPFFINNELSEN

Fibroblastvekstfaktorer er store polypeptider vidt uttrykt i vev under utvikling og voksne vev (Baird et al., *Cancer Cells*, 3:239-243, 1991) og spiller avgjørende roller i mange fysiologiske funksjoner inkludert angiogenese, mitogenese, mønsterdannelse, cellulær differensiering, metabolsk regulering og reparasjon av vevsskade (McKeehan et al., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 59:135-176, 1998; Burgess, W. H. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 58:575-606 (1989). De prototypiske fibroblastvekstfaktorene (FGFer), FGF-1 og FGF-2, ble opprinnelig isolert fra hjerne og hypofyse som mitogener for fibroblaster. FGF-3 ble identifisert til å være et vanlig mål for aktivering ved musebrysttumorviruset (Dickson et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 638:18-26 (1991); FGF-4 til FGF-6 ble identifisert som onkogene produkter (Yoshida et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 638:27-37 (1991); Goldfarb et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 638:38-52 (1991); Coulier et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 638:53-61 (1991)). FGF-10 ble identifisert fra rottelunge ved homologi-basert polymerasekjedereaksjon (PCR) (Yamasaki et al., *J. Biol. Chem.* 271:15918-15921 (1996)). FGF-11 til FGF-14 (FGF homologe faktorer (FHFer) 1 til 4) ble identifisert fra human retina ved en kombinasjon av tilfeldig cDNA-sekvensering, databasesøk og homologi-basert PCR (Smallwood et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9850-9857 (1996)). FGF-15 ble identifisert som et nedstrømsmål av et kimært homeodomene onkoprotein (McWhirter et al., *Development* 124:3221-3232 (1997)). FGF-16, FGF-17 og FGF-18 ble identifisert fra henholdsvis rottehjerte og embryoer ved homologi-basert PCR (Miyake et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243:148-152 (1998); Hoshikawa et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:187-191 (1998); Ohbayashi et al., *J. Biol. Chem.* 273:18161-18164 (1998)). FGF-19 ble identifisert fra human føtal hjerne ved databasesøk (Nishimura et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1444:148-151 (1999)). De har en bevart ~120-aminosyrerestkjerne med -30 til 60 % aminosyreidentitet.

Dyremodeller, overekspresjon og analyse av naturlig forekommende mutasjoner impliserer fibroblastvekstfaktorer og deres reseptorer i en lang rekke sykdommer (f.eks. Wilkie et al., *Current Biology*, (1995) 5:500-507; Pugh-Humphreys et al, i: *The Cytokine*

Handbook, A. Thomson red, 2. utgave, Academic Press, Harcourt Brace & co. publishers, London, pp 525-566) som foreslår at regulering av aktivitet kunne bli brukt for behandling. For eksempel, vil inhibering av fibroblastvekstfaktor-2 ved forbindelsen Suramin forhindre neovaskularisering og tumorvekst i mus (Pesenti et al., British Journal of Cancer, 66:367-372). Fibroblastvekstfaktorer fungerer også i angiogenese (Lyons, M. K., et al., Brain Res. (1991) 558:315-320), sårhelbredelse (Uhl, E., et al., Br. J. Surg. (1993) 80:977-980, 1993), astrogliose, glial celleproliferasjon og differensiering (Biagini, G. et al., Neurochem. Int. (1994) 25:17-24), cerebral vasodilasjon (Tanaka, R. et al., Stroke (1995) 26:2154-2159), og nevrotrofiske/nevromodulatoriske prosesser.

Fibroblastvekstfaktor har også mange positive virkninger inkludert blodstrøm og beskyttelse mot kalsiumtoksisitet for å forbedre resultatet ved cerebral iskemi (Mattson, M. P. et al., Semin. Neurosci. (1993) 5:295-307; Doetrocj. W. D. et al., J. Neurotrauma (1996) 13:309-316). Grunnleggende FGF-behandling fremmer neoangiogenese i iskemisk myokardium (Schumacher et al., Circulation (1998) 97: 645-650). Grunnleggende FGF forsterker funksjonell helbredelse og fremmer nevronspiring) etter fokal cerebralt infarkt (Kawamata et al., Proc.Natl. Acad. Sci.(1997) 94 (15):8179-84). Ifølge den publiserte litteraturen, består FGF-familien av minst tjue-to medlemmer (Reuss et al., Cell Tissue Res. 313:139-157 (2003)).

Fibroblastvekstfaktor 21 (FGF-21) har blitt rapportert å bli foretrukket uttrykt i leveren (Nishimura et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206 (2000); WO 01/36640; og WO 01/18172) og beskrevet som en behandling for iskemisk vaskulær sykdom, sårhelbredelse og sykdommer assosiert med tap av pulmonale, bronkie eller alveolære celler eller funksjon og tallrike andre lidelser. FGF-21 blir primært uttrykt i lever-, nyre- og muskelvev (se eksempel 2 i US patentpublikasjon nr. 20040259780). FGF-21 genet er sammensatt av 3 eksoner og er lokalisert på kromosom 19. Ulikt andre FGFER, har FGF-21 ikke proliferative og tumorigene virkninger (Genome Biol. 2001;2(3):REVIEWS3005).

US patentpublikasjon nr. 20010012628 beskriver et nukleotid og proteinsekvens for human FGF-21 (se henholdsvis SEKV ID NR: 1 og 2, i US patentpublikasjon nr. 20010012628). SEKV ID NR: 2 i publikasjonen nevnt over, refererte til sbgFGF-19, er 209 aminosyrer i lengde og inneholder en 28 aminosyre ledersekvens ved N-terminusen. Den humane FGF-21 sekvensen presentert som SEKV ID NR: 3 heri er den samme sekvensen som SEKV ID NR: 2 ifølge US patentpublikasjon nr. 20010012628. Denne sekvensen har en enkelt nukleotid polymorfisme (SNP) med prolin (P) ved posisjon 174, i det følgende referert til som "209 aminosyre P-formen av FGF-21."

US Patent nr. 6,716,626 diskuterer human FGF-21 og homologe proteiner i andre pattedyr, spesielt mus og rotter. Muse FGF vist som SEKV ID NR: 1 ifølge US Patent nr. 6,716,626 ble i høy grad uttrykt i lever og uttrykt i testikkelen og tymus, og det ble foreslått at human FGF-21 kan spille en rolle i utvikling av og rekonvalesens fra

leversykdom og/eller lidelser ved testikulær funksjon eller funksjon av celler avledet fra tymus. SEKV ID NR: 4 ifølge US Patent nr. 6,716,626 er 209 aminosyrer i lengde og inneholder en 28 aminosyre ledersekvens ved N-terminusen. Den humane FGF-21 sekvensen presentert som SEKV ID NR: 6 heri er den samme sekvensen som SEKV ID NR: 4 ifølge US patent nr. 6,716,626. Denne sekvensen har en enkelt nukleotid polymorfisme (SNP) med leucin (L) ved posisjon 174, i det følgende referert til som "209 aminosyre L-formen av FGF-21."

U.S. patentpublikasjon nr. 20040259780 diskuterer human FGF-21 og presenterer en sekvens som er 208 aminosyrer i lengde (SEKV ID NR: 2 ifølge U.S. patentpublikasjon nr. 20040259780) og inneholder en 27 aminosyre ledersekvens ved N-terminusen. Den humane FGF-21 sekvensen presentert som SEKV ID NR: 7 heri er den samme sekvensen som SEKV ID NR: 2 ifølge U.S. patentpublikasjon nr. 20040259780. Denne sekvensen har en enkelt nukleotid polymorfisme (SNP) med leucin (L) ved posisjon 173, i det følgende referert til som "208 aminosyre L-formen av FGF-21."

FGF-21 har blitt vist å stimulere glukose-opptak i muse 3T3-L1 adipocytter i nærværet og fraværet av insulin, og å redusere fôret og fastende blodglukose, triglyserider, og glukagonnivåer i *ob/ob* og *db/db* mus og 8 uker gamle ZDF rotter på en dose-avhengig måte, og tilveiebringer således grunnlaget for anvendelsen av FGF-21 som en terapi for å behandle diabetes og obesitet (WO 03/011213 og Kharitononkov et al. J Clin Invest. 2005 Jun;115(6):1627-35). Kharitononkov et al. J Clin Invest. 2005 Jun;115(6): 1627-35 viste også at transgene mus som uttrykker human FGF-21 er hypoglykemiske, sensitive overfor insulin og resistente overfor diett-indusert obesitet. Kharitononkov et al. Endocrinology (under utgivelse) viser også at FGF-21 senket glukose, triglyserider, insulin og glukagoner i diabetiske rhesusaper.

I tillegg har FGF-21 blitt vist å være effektiv for å redusere mortaliteten og morbiditeten til kritisk syke pasienter (WO 03/059270). FGF-21 har i U.S. patentsøknad 20050176631, blitt beskrevet som å påvirke den totale metabolske tilstand og kan motvirke negative bivirkninger som kan forekomme i løpet av kroppens stressrespons til sepsis så vel som systemisk inflammatorisk respons syndrom (SIRS) som resulterer fra ikke-infeksiøse patologiske årsaker. Derfor kan FGF-21 bli brukt for å redusere mortaliteten og morbiditeten som forekommer i kritisk syke pasienter. Kritisk syke pasienter inkluderer de pasientene som er fysiologisk ustabile og krever kontinuerlig, koordinert legebehandling, sykepleie og respiratorisk pleie. Denne typen pleie nødvendiggjør det å ha spesiell oppmerksomhet overfor detaljer for å sørge for konstant overvåkning og titrering av terapi. Kritisk syke pasienter inkluderer de pasientene som har risiko for fysiologisk dekompenisering og derfor krever konstant overvåkning slik at intensiv-pleie teamet kan tilveiebringe umiddelbar inngripen for å forhindre ugunstige hendelser. Kritisk syke pasienter har spesielle behov for overvåkning og livredning som må bli tilveiebrakt ved et team som kan tilveiebringe kontinuerlig titrert pleie.

PEGylerte FGF-21 polypeptider er beskrevet i WO 2005/091944. FGF-21 polypeptidet beskrevet i WO 2005/091944 er et 181 aminosyre polypeptid. Den modne, vill-type eller naturlige humane FGF-21 sekvensen indikert som SEKV ID NR: 1 ifølge WO 2005/091944 mangler en ledersekvens. Denne humane FGF-21 er i høy grad identisk med muse-FGF-21 (~79 % aminosyreidentitet) og rotte-FGF-21 (~80 % aminosyreidentitet). Den humane FGF-21 sekvensen presentert som SEKV ID NR: 5 heri er den samme sekvensen som SEKV ID NR: 1 ifølge WO 05/091944. Denne sekvensen har en enkelt nukleotid polymorfisme (SNP) med leucin (L) ved posisjon 146. En fagperson kunne lett bruke alternative mammalske-FGF-21 polypeptidsekvenser eller analoger, muteiner eller derivater som har tilstrekkelig homologi til de humane FGF-21 sekvenser for anvendelsene beskrevet heri.

Den humane FGF-21 sekvensen presentert som SEKV ID NR: 1 heri har en enkelt nukleotid polymorfisme (SNP) med prolin (P) ved posisjon 146. En N-terminal Histag versjon av SEKV ID NR: 1 er vist som SEKV ID NR: 2 heri.

WO 2005/091944 beskriver den kovalente tilknytningen av ett eller flere molekyler av PEG til spesielle rester av en FGF-21 forbindelse. Den resulterende forbindelsen var en biologisk aktiv, PEGylert FGF-21 forbindelse med en forlenget elimineringshalveringstid og redusert clearance sammenlignet med den for naturlig FGF-21. PEG molekylene ble kovalent festet til cystein- eller lysinrester. Substitusjoner ble gjort ved ulike posisjoner med cystein for å tillate tilknytning av minst ett PEG-molekyl. PEGylering ved én eller flere lysinrester (56, 59, 69 og 122) ble beskrevet.

PEGylerte FGF-21 forbindelser ville være nyttige i behandling av subjekter med lidelser, inkludert, men ikke begrenset til, type 2 diabetes, obesitet, insulinresistens, hyperinsulinemi, glukoseintoleranse, hyperglykemi og metabolsk syndrom. Det ville være spesielt fordelaktig å ha PEGylerte FGF-21 forbindelser som kunne øke virksamhet ved å sørge for en lengre sirkulerende halveringstid og som ville kreve færre doser, øke både bekvemmeligheten for et subjekt med behov for slik terapi og sannsynligheten for et subjekts etterlevelse med doseringskrav. Metabolsk syndrom kan bli definert som en gruppe av minst tre av de følgende tegn: abdominalt fett – hos de fleste menn, en 40-tommers livvidde eller større; høyt blodsukker- minst 110 milligram per desiliter (mg/dl) etter fasting; høye triglyserider - minst 150 mg/dl i blodstrømmen; lavt HDL-mindre enn 40 mg/dl; og blodtrykk på 130/85 eller høyere.

Kovalent tilknytning av den hydrofile polymeren poly(etylglykol), forkortet PEG, er en fremgangsmåte for å øke vannløselighet, biologisk tilgjengelighet, øke serumhalveringstid, øke terapeutisk halveringstid, modulere immunogenisitet, modulere biologisk aktivitet eller forlenge sirkuleringstiden for mange biologisk aktive molekyler, inkludert proteiner, peptider og spesielt hydrofobe molekyler. PEG har blitt brukt i stor utstrekning i farmasøytika, på kunstige implantater og i andre anvendelser hvor biokompatibilitet, mangel på toksisitet og mangel på immunogenisitet er viktig. For å

maksimere de ønskede egenskapene av PEG, må den totale molekylvekten og hydratiseringstilstanden av PEG-polymeren eller polymerene festet til det biologisk aktive molekylet være tilstrekkelig høy til å gi de fordelaktige karakteristikene typisk assosiert med PEG-polymertilknytning, så som øket vannløselighet og sirkulerende halveringstid, mens en ikke ugunstig påvirker bioaktiviteten for opphavsmolekylet.

PEG-derivater blir hyppig knyttet til biologisk aktive molekyler gjennom reaktive kjemiske funksjonaliteter, så som lysin-, cystein- og histidinrester, N-terminusen og karbohydratandeler. Det har blitt forsket på formuleringen av en terapeutisk FGF-21 forbindelse, men det har vært problematisk av mange årsaker, én av disse er fordi proteiner og andre molekyler ofte har et begrenset antall reaktive seter tilgjengelig for polymertilknytning. Ofte spiller setene mest egnet for modifikasjon via polymertilknytning en signifikant rolle i reseptorbinding, og er nødvendige for bevaring av den biologiske aktiviteten av molekylet. Som et resultat, fører vilkårlig tilknytning av polymerkjeder til slike reaktive seter på et biologisk aktivt molekyl ofte til en signifikant reduksjon eller til og med totalt tap av biologisk aktivitet for det polymer-modifiserte molekylet. R. Clark et al., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271:21969-21977. For å danne konjugater som har tilstrekkelig polymermolekylvekt for å gi de ønskede fordelene til et målmolekyl, har tilnærmelser ifølge tidligere teknikk typisk involvert tilfeldig tilknytning av tallrike polymerarmer til molekylet, noe som derved øker risikoen for en reduksjon eller til og med totalt tap av bioaktivitet for opphavsmolekylet.

Reaktive seter som danner lociene for tilknytning av PEG-derivater til proteiner er diktert ved proteinets struktur. Proteiner, inkludert enzymer, er sammensatt av ulike sekvenser av alfa-aminosyrer, som har den generelle strukturen  $H_2N-CHR-COOH$ . Alfa-aminoandelen ( $H_2N-$ ) av én aminosyre forbindes til karboksylendelen ( $-COOH$ ) av en tilgrensende aminosyre for å danne amidbindinger, som kan bli representert som  $-(NH-CHR-CO)_n-$ , hvor suffikset "n" kan være lik hundrer eller tusener. Fragmentet representert ved R kan inneholde reaktive seter for protein-biologisk aktivitet og for tilknytning av PEG-derivater.

For eksempel, i tilfellet med aminosyren lysin, eksisterer det en  $-NH_2$  andel i epsilon-posisjonen så vel som i alfa-posisjonen. Epsilon  $-NH_2$  er fritt for reaksjon under betingelser med basisk pH. Mye av teknikken innen feltet proteinderivatisering med PEG har blitt rettet mot utvikling av PEG-derivater for tilknytning til epsilon  $-NH_2$ -andelen av lysinrester som foreligger i proteiner. "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, s. 1-17. Disse PEG-derivatene har imidlertid alle den felles begrensning, at de ikke kan bli installert selektivt blant de ofte tallrike lysinrester som foreligger på overflatene av proteiner. Dette kan være en signifikant begrensning i tilfeller hvor en lysinrest er viktig for proteinaktivitet, for eksempel eksisterer i et enzymaktivt sete, eller i tilfeller hvor en lysinrest spiller en rolle i

mediering av vekselvirkningen av proteinet med andre biologiske molekyler, som i tilfellet med reseptorbindings seter.

En andre og like viktig komplikasjon ved eksisterende fremgangsmåter for protein-PEGylering er at PEG-derivatene kan undergå uønskede sidereaksjoner med rester andre enn de ønsket. Histidin inneholder en reaktiv imino-andel, representert strukturelt som -N(H)-, men mange kjemisk reaktive typer som reagerer med epsilon -NH<sub>2</sub> kan også reagere med -N(H)-. På lignende måte bærer sidekjeden av aminosyren cystein en fri sulfhydryl-gruppe, representert strukturelt som -SH. I noen tilfeller, reagerer PEG-derivatene rettet ved epsilon-NH<sub>2</sub> gruppen av lysin også med cystein, histidin eller andre rester. Dette kan danne komplekse, heterogene blandinger av PEG-derivatiserte bioaktive molekyler og risikerer å ødelegge aktiviteten av det bioaktive molekylet som er målsøkt. Det ville være ønskelig å utvikle PEG-derivater som tillater at en kjemisk funksjonell gruppe blir introdusert ved et enkelt sete innen proteinet som så ville muliggjøre den selektive koplingen av én eller flere PEG-polymerer til det bioaktive molekylet ved spesifikke seter på proteinoverflaten som både er vel-definerte og forutsigbare.

I tillegg til lysinrester, har det blitt rettet betydelig innsats innen faget mot utviklingen av aktiverte PEG-reagenser som målsøker andre aminosyresidekjeder, inkludert cystein, histidin og N-terminusen. *Se, f.eks.* U.S. pat. nr. 6,610,281 og "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, s. 1-17. En cysteinrest kan bli introdusert sete-selektivt til strukturen av proteiner ved anvendelse av seterettet mutagenese og andre teknikker kjent innen faget, og den resulterende frie sulfhydryl-andelen kan bli reagert med PEG-derivater som bærer tiol-reaktive funksjonelle grupper. Denne tilnærmelsen er imidlertid komplisert, ved at introduksjonen av en fri sulfhydryl-gruppe kan komplisere ekspresjonen, foldingen og stabiliteten av det resulterende proteinet. Det ville derfor være ønskelig å ha en måte for å introdusere en kjemisk funksjonell gruppe til FGF-21 som muliggjør den selektive koplingen av én eller flere PEG-polymerer til proteinet mens det samtidig er kompatibelt med (dvs. ikke engasjert i uønskede sidereaksjoner med) sulfhydryler og andre kjemisk funksjonelle grupper typisk funnet i proteiner.

Som det kan sees fra en punktprøving av faget, har mange av disse derivatene som har blitt utviklet for tilknytning til sidekjedene av proteiner, spesielt, -NH<sub>2</sub> andelen på lysin-aminosyre-sidekjeden og -SH andelen på cystein-sidekjeden, vist seg problematisk i deres syntese og bruk. Noen danner ustabile bindinger med proteinet som er utsatt for hydrolyse og derfor dekomponerer, brytes ned, eller på annen måte er ustabile i vandige miljøer, så som i blodstrømmen. Noen danner mer stabile bindinger, men er utsatt for hydrolyse før bindingen blir dannet, noe som betyr at den reaktive gruppen på PEG-derivatet kan bli inaktivert før proteinet kan bli festet. Noen er ganske toksiske og er derfor mindre egnet for bruk in vivo. Noen er for langsomme å reagere til å være praktisk nyttige. Noen resulterer i et tap av proteinaktivitet ved festing til seter som er ansvarlige

for proteinets aktivitet. Noen er ikke spesifikke i setene som de vil feste seg til, noe som også kan resultere i et tap av ønskelig aktivitet og i en mangel på reproduserbarhet for resultater. For å overkomme utfordringene assosiert med modifisering av proteiner med poly(etylenglykol)-andeler, har det blitt utviklet PEG-derivater som er mer stabile (f.eks. U.S. patent 6,602,498) eller som reagerer selektivt med tiolandeler på molekyler og overflater (f.eks. U.S. patent 6,610,281). Det er tydelig et behov innen faget for PEG-derivater som er kjemisk inerte i fysiologiske miljøer inntil påkalt for å reagere selektivt for å danne stabile kjemiske bånd.

I det siste har en fullstendig ny teknologi blitt rapportert innen proteinvitenskapen, som lover å overkomme mange av begrensningene assosiert med sete-spesifikke modifikasjoner av proteiner. Spesifikt har nye komponenter blitt lagt til det protein-biosyntetiske maskineriet av den prokaryote *Escherichia coli* (*E. coli*) (f.eks. L. Wang, et al., (2001), *Science* 292:498-500) og den eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (f.eks. J. Chin et al., *Science* 301:964-7 (2003)), som har muliggjort inkorporeringen av ikke-genetisk kodede aminosyrer til proteiner in vivo. Flere nye aminosyrer med nye kjemiske, fysiske eller biologiske egenskaper, inkludert fotoaffinitetsmerker og fotoisomeriserbare aminosyrer, fotokryssbindende aminosyrer (se, f.eks. Chin, J. W., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:11020-11024; og, Chin, J. W., et al., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027), keto-aminosyrer, tungt-atomholdige aminosyrer og glykosylerte aminosyrer har blitt inkorporert effektivt og med høy nøyaktighet i proteiner i *E. coli* og i gjær som svar på amberkodonet, TAG, ved anvendelse av denne metodologien. Se, f.eks. J. W. Chin et al., (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), *ChemBioChem* 3(11):1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), *PNAS United States of America* 99:11020-11024; og, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1:1-11. Disse studiene har bevist at det er mulig å selektivt og rutinemessig introdusere kjemisk funksjonelle grupper, så som ketongrupper, alkylgrupper og azid-andeler, som ikke blir funnet i proteiner, som er kjemisk inerte overfor alle de funksjonelle gruppene funnet i de 20 vanlige, genetisk-kodede aminosyrene og som kan bli brukt for å reagere effektivt og selektivt for å danne stabile kovalente bindinger.

Evnen til å inkorporere ikke-genetisk kodede aminosyrer i proteiner tillater introduksjonen av kjemisk funksjonelle grupper som kunne tilveiebringe verdifulle alternativer til de naturlig-forekommende funksjonelle gruppene, så som epsilon -NH<sub>2</sub> i lysin, sulfhydryl -SH i cystein, iminogruppen i histidin, etc. Visse kjemisk funksjonelle grupper er kjent for å være inerte overfor de funksjonelle gruppene funnet i de 20 vanlige, genetisk-kodede aminosyrene men reagerer rent og effektivt for å danne stabile bindinger. Azid- og acetylengrupper, er for eksempel kjent innen faget for å undergå en Huisgen [3+2] sykloaddisjonsreaksjon i vandige betingelser i nærvær av en katalytisk mengde kobber. Se, f.eks. Tornøe, et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; og, Rostovtsev, et



al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599. Ved å introdusere en azid-andel i en proteinstruktur, er en for eksempel i stand til å inkorporere en funksjonell gruppe som er kjemisk inert overfor aminer, sulfhydryler, karboksylsyrer, hydroksylgrupper funnet i proteiner, men som også reagerer jevnt og effektivt med en acetylenandel for å danne et sykloaddisjonsprodukt. Viktig, i fraværet av acetylenandelen, forblir azidet kjemisk inert og ureaktivt i nærvær av andre proteinsidekjeder og under fysiologiske betingelser.

Nishimura et al. (2000) *BBA* 1492, 203-206, og WO01/36640 viser oppdagelsen av FGF-21. WO01/1817 viser kjemisk modifikasjon, så som PEGylering av FGF-21. WO2005/074546 viser humant veksthormon polypeptider med modifiserte eller forbedrede egenskaper. WO2006/050247 og WO2005/091944 viser den kjemiske modifikasjonen av FGF-21 for å forbedre egenskapene derav.

US 2006/194256 og US 7,259,248 viser modifiserte polypeptider som omfatter unaturlige aminosyrer, og fremgangsmåter for fremstilling av de samme.

Foreliggende oppfinnelse tar fatt på, blant andre ting, problemer assosiert med aktiviteten og produksjonen av FGF-21 polypeptider, og tar også fatt på produksjonen av et FGF-21 polypeptid med forbedrede biologiske eller farmakologiske egenskaper, så som forbedret terapeutisk halveringstid.

## OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Denne oppfinnelsen tilveiebringer et FGF-21 polypeptid omfattende en sekvens vist i SEKV ID NR: 1-7, unntatt at én aminosyre er substituert ved en ikke-naturlig kodet aminosyre ved posisjon 108 (SEKV ID NR:1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV ID NR: 2-7), hvori en vannløselig polymer er knyttet til den ikke-naturlig kodede aminosyren som foreligger i nevnte FGF-21 polypeptid.

I noen utførelsesformer er FGF-21 polypeptidet knyttet til en linker, polymer eller biologisk aktivt molekyl. I noen utførelsesformer er FGF-21 polypeptidet knyttet til en bifunksjonell polymer, bifunksjonell linker eller minst ett ytterligere FGF-21 polypeptid.

Den ikke-naturlig kodede aminosyren er knyttet til en vannløselig polymer. I noen utførelsesformer, omfatter den vannløselige polymeren en poly(etylenglykol)andel. I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig kodede aminosyren knyttet til den vannløselige polymeren med en linker eller er bundet til den vannløselige polymeren. I noen utførelsesformer er poly(etylenglykol)molekylet en bifunksjonell polymer. I noen utførelsesformer er den bifunksjonelle polymeren knyttet til et andre polypeptid. I noen utførelsesformer er det andre polypeptidet et FGF-21 polypeptid.

I noen utførelsesformer omfatter FGF-21 polypeptidet minst to aminosyrer knyttet til en vannløselig polymer omfattende en poly(etylenglykol)andel. I noen utførelsesformer er minst én aminosyre en ikke-naturlig kodet aminosyre.

Én ikke-naturlig kodet aminosyre er inkorporert i den følgende posisjonen i FGF-21: 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I noen

utførelsesformer, blir FGF-21 sekresjonskonstrukt klonet inn i pVK7ara (Nde/Eco) med en ledersekvens valgt fra SEKV IDer NR: 39, 40, 41, 42, 43 eller 44.

I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig forekommende aminosyren ved én av disse posisjonene knyttet til en vannløselig polymer ved posisjon: 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7).

I noen utførelsesformer av redegjørelsene omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som modulerer affinitet av FGF-21 polypeptidet for en FGF-21 polypeptidreseptor eller bindingspartner, inkludert men ikke begrenset til, et protein, polypeptid, lite molekyl eller nukleinsyre. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som øker stabiliteten av FGF-21 polypeptidet sammenlignet med stabiliteten av den tilsvarende FGF-21 uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som modulerer immunogenisiteten av FGF-21 polypeptidet sammenlignet med immunogenisiteten av den tilsvarende FGF-21 uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen. I noen utførelsesformer av redegjørelsen omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som modulerer serum-halveringstid eller sirkuleringstid av FGF-21 polypeptidet sammenlignet med serum-halveringstiden eller sirkuleringstiden av den tilsvarende FGF-21 uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen.

I noen utførelsesformer av redegjørelsen omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som øker den vandige løseligheten av FGF-21 polypeptidet sammenlignet med vandig løselighet av den tilsvarende FGF-21 uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som øker løseligheten av FGF-21 polypeptidet produsert i en vertscelle sammenlignet med løseligheten av den tilsvarende FGF-21 uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som øker ekspresjonen av FGF-21 polypeptidet i en vertscelle eller øker syntese in vitro sammenlignet med ekspresjonen eller syntesen av den tilsvarende FGF-21 uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen. FGF-21 polypeptidet omfattende denne substitusjonen bevarer agonistaktivitet og bevarer eller forbedrer ekspresjonsnivåer i en vertscelle. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som øker proteaseresistens av FGF-21 polypeptidet sammenlignet med proteaseresistensen for den tilsvarende FGF-21 uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen. U.S. patent nr. 6,716,626 indikerte at potensielle seter som kan bli substituert for å endre proteasespalting inkluderer, men ikke er begrenset til, et monobasisk sete innen 2 rester fra et prolin. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som modulerer signaltransduksjonaktivitet av FGF-21 reseptoren sammenlignet med aktiviteten av

reseptoren etter vekselvirkning med det tilsvarende FGF-21 polypeptidet uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som modulerer dets binding til et annet molekyl så som en reseptor sammenlignet med bindingen av det tilsvarende FGF-21 polypeptidet uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen.

I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidet en substitusjon, addisjon eller delesjon som øker kompatibilitet av FGF-21 polypeptidet med farmasøytiske konserveringsmidler (f.eks. *m*-kresol, fenol, benzylalkohol) sammenlignet med kompatibilitet av den tilsvarende FGF-21 uten substitusjonen, addisjonen eller delesjonen. Denne økte kompatibiliteten ville muliggjøre fremstillingen av en konservert farmasøytisk formulering som opprettholder de fysiokjemiske egenskaper og biologiske aktivitet av proteinet i løpet av lagring. WO 2005/091944 diskuterer de følgende eksempler på FGF-21 muteiner med forbedret farmasøytisk stabilitet: substitusjonen med en ladet og/eller polar men uladet aminosyre for én av de følgende: glysin 42, glutamin 54, arginin 77, alanin 81, leucin 86, fenylalanin 88, lysin 122, histidin 125, arginin 126, prolin 130, arginin 131, leucin 139, alanin 145, leucin 146, isoleucin 152, alanin 154, glutamin 156, glysin 161, serin 163, glysin 170 eller serin 172 ifølge SEKV ID NR: 1 ifølge WO 05/091944. Et FGF-21 polypeptid ifølge foreliggende redegjørelse kan inkludere én eller flere av disse substitusjonene ved den tilsvarende posisjonen i polypeptidet og/eller kan inkludere én eller flere andre substitusjoner, addisjoner eller delesjoner. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, blir én eller flere ikke-naturlige aminosyrer substituert ved én eller flere av de følgende posisjonene: glysin 42, glutamin 54, arginin 77, alanin 81, leucin 86, fenylalanin 88, lysin 122, histidin 125, arginin 126, prolin 130, arginin 131, leucin 139, alanin 145, prolin/leucin 146, isoleucin 152, alanin 154, glutamin 156, glysin 161, serin 163, glysin 170, serin 172 SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I noen utførelsesformer av redegjørelsen, er én eller flere ikke-naturlige aminosyrer substituert ved én eller flere av de følgende posisjonene: glutamat 91, arginin 131, glutamin 108, arginin 77, arginin 72, histidin 87, leucin 86, arginin 126, glutamat 110, tyrosin 83, prolin 146, arginin 135, arginin 96, arginin 36, (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7).

WO 05/091944 beskriver ytterligere muteiner av FGF-21 med forbedret farmasøytisk stabilitet. Slike muteiner inkluderer substitusjonen av et cystein for to eller flere av de følgende i FGF-21 (se SEKV ID NR: 1 ifølge WO 05/091944): arginin 19, tyrosin 20, leucin 21, tyrosin 22, treonin 23, aspartat 24, aspartat 25, alanin 26, glutamin 27, glutamin 28, alanin 31, leucin 33, isoleucin 35, leucin 37, valin 41, glysin 42, glysin 43, glutamat 50, glutamin 54, leucin 58, valin 62, leucin 66, glysin 67, lysin 69, arginin 72, fenylalanin 73, glutamin 76, arginin 77, aspartat 79, glysin 80, alanin 81, leucin 82, glysin 84, serin 85, prolin 90, alanin 92, serin 94, fenylalanin 95, leucin 100, aspartat 102, tyrosin 104, tyrosin 107, serin 109, glutamat 110, prolin 115, histidin 117, leucin 118,

prolin 119, asparagin 121, lysin 122, serin 123, prolin 124, histidin 125, arginin 126, aspartat 127, alanin 129, prolin 130, glysin 132, alanin 134, arginin 135, leucin 137, prolin 138 eller leucin 139. FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende redegjørelse kan inkludere én eller flere av disse substitusjonene ved den tilsvarende posisjonen i

5 polypeptidet og/eller kan inkludere én eller flere andre substitusjoner, addisjoner eller delesjoner. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, er én eller flere ikke-naturlige aminosyrer substituert ved én eller flere av de følgende posisjonene: arginin 19, tyrosin 20, leucin 21, tyrosin 22, treonin 23, aspartat 24, aspartat 25, alanin 26, glutamin 27, glutamin 28, alanin 31, leucin 33, isoleucin 35, leucin 37, valin 41, glysin 42, glysin 43,

10 glutamat 50, glutamin 54, leucin 58, valin 62, leucin 66, glysin 67, lysin 69, arginin 72, fenylalanin 73, glutamin 76, arginin 77, aspartat 79, glysin 80, alanin 81, leucin 82, glysin 84, serin 85, prolin 90, alanin 92, serin 94, fenylalanin 95, leucin 100, aspartat 102, tyrosin 104, tyrosin 107, serin 109, glutamat 110, prolin 115, histidin 117, leucin 118, prolin 119, asparagin 121, lysin 122, serin 123, prolin 124, histidin 125, arginin 126,

15 aspartat 127, alanin 129, prolin 130, glysin 132, alanin 134, arginin 135, leucin 137, prolin 138 eller leucin 139 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7).

WO 05/091944 beskriver videre spesifikke muteiner av FGF-21 med snekrede (engineered) disulfidbindinger (aminosyrer substituert med cystein), i tillegg til den

20 naturlig forekommende ene ved Cys75-Cys93, er som følger: Gln76Cys-Ser109Cys, Cys75-Ser85Cys, Cys75-Ala92Cys, Phe73Cys-Cys93, Ser123Cys-His125Cys, Asp102Cys-Tyr104Cys, Asp127Cys-Gly132Cys, Ser94Cys-Glu110Cys, Pro115Cys-His117Cys, Asn121Cys-Asp127Cys, Leu100Cys-Asp102Cys, Phe95Cys-Tyr107Cys, Arg19CysPro138Cys, Tyr20Cys-Leu139Cys, Tyr22Cys-Leu137Cys, Arg77Cys-

25 Asp79Cys, Pro90Cys-Ala92Cys, Glu50Cys-Lys69Cys, Thr23Cys-Asp25Cys, Ala31Cys-Gly43Cys, Gln28Cys-Gly43Cys, Thr23Cys-Gln28Cys, Val41Cys-Leu82Cys, Leu58Cys-Val62Cys, Gln54Cys-Leu66Cys, Ile35Cys-Gly67Cys, Gly67Cys-Arg72Cys, Ile35Cys-Gly84Cys, Arg72Cys-Gly84Cys eller Arg77Cys-Ala81Cys, hvor nummereringen er basert på SEKV ID NR: 1 ifølge WO 05/091944. Ytterligere muteiner med snekrede

30 disulfidbindinger er Tyr22Cys-Leu139Cys; Asp24Cys-Arg135Cys; Leu118Cys-Gly132Cys; His117Cys-Pro130Cys; His117Cys-Ala129Cys; Leu82Cys-Pro119Cys; Gly80Cys-Ala129Cys; Gly43Cys-Pro124Cys; Gly42Cys-Arg126Cys; Gly42Cys-Pro124Cys; Gln28Cys-Pro124Cys; Gln27Cys-Ser123Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; eller Asp25Cys-Lys122Cys, hvor nummereringen er basert på SEKV ID NR: 1 ifølge WO

35 05/091944. Ytterligere muteiner med snekrede disulfidbindinger er Leu118Cys-Ala134Cys; Leu21Cys-Leu33Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; Leu21Cys-Leu33Cys/Leu118Cys-Ala134Cys, hvor nummereringen er basert på SEKV ID NR: 1 ifølge WO 05/091944. FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende redegjørelse kan inkludere én eller flere av disse substitusjonene ved de(n) tilsvarende posisjonen(e) i

polypeptidet og/eller kan inkludere én eller flere andre substitusjoner, addisjoner, eller delesjoner. FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende redegjørelse kan inkludere én eller flere av disse substitusjonene ved de(n) tilsvarende posisjonen(e) i polypeptidet (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I noen

5 utførelsesformer, kan FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende redegjørelse inkludere én eller flere av disse substitusjonene ved de tilsvarende posisjonene fra før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen) til og med C terminusen i SEKV IDer NR: 34-36.

WO 05/091944 beskriver ytterligere muteiner av FGF-21 som ble PEGylert. Disse muteinene hadde én av de følgende substitusjonene: D25C, D38C, L58C, K59C, P60C, 10 K69C, D79C, H87C, E91C, E101C, D102C, L114C, L116C, K122C, R126C, P130C, P133C, P140C. FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende redegjørelse kan inkludere én eller flere av disse substitusjonene ved den tilsvarende posisjonen i polypeptidet og/eller kan inkludere én eller flere andre substitusjoner, addisjoner eller delesjoner. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, er én eller flere ikke-naturlige aminosyrer substituert 15 ved én eller flere av de følgende posisjonene: 25, 38, 58, 59, 60, 69, 79, 87, 91, 101, 102, 114, 116, 122, 126, 130, 133, 140 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I noen utførelsesformer av redegjørelsen, kan FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse inkludere én eller flere av disse substitusjonene ved de tilsvarende posisjoner fra før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen) til og med C terminusen 20 i SEKV IDer NR: 34-36.

WO 05/091944 beskriver cystein-substitusjoner ved de følgende posisjonene: 19, 21, 26, 28, 29, 30, 36, 39, 42, 50, 56, 61, 64, 65, 68, 70, 71, 77, 81, 85, 86, 90, 92, 94, 98, 107, 108, 112, 113, 123 og 124. WO 05/091944 indikerer cystein-substitusjoner ved de følgende posisjonene: 24, 27, 37, 40, 44, 46, 49, 57, 88, 89, 106, 110, 111, 115, 120 og 25 139. WO 05/091944 beskriver også cystein-substitusjoner ved de følgende posisjonene: 18, 45, 47, 48, 78, 83, 99, 103, 125, 128, 131, 132 og 138. WO 05/091944 beskriver også cystein-substitusjoner ved de følgende posisjonene: 25, 38, 58, 59, 60, 69, 79, 87, 91, 101, 102, 114, 116, 122, 126, 130, 133 og 140.

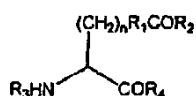
I noen utførelsesformer, blir én eller flere snekrede bindinger dannet med én eller 30 flere ikke-naturlige aminosyrer. Den intramolekylære bindingen kan bli dannet på mange måter, inkludert men ikke begrenset til, en reaksjon mellom to aminosyrer i proteinet under egnede betingelser (én eller begge aminosyrer kan være en ikke-naturlig aminosyre); en reaksjon med to aminosyrer, hver av disse kan være naturlig kodet eller ikke-naturlig kodet, med en linker, polymer eller annet molekyl under egnede betingelser; 35 etc.

I noen utførelsesformer av redegjørelsen, kan én eller flere aminosyresubstitusjoner i FGF-21 polypeptidet være med én eller flere naturlig forekommende eller ikke-naturlig forekommende aminosyrer. I noen utførelsesformer av redegjørelsen kan aminosyresubstitusjonene i FGF-21 polypeptidet være med naturlig forekommende eller

ikke-naturlig forekommende aminosyrer, forutsatt at minst én substitusjon er med en ikke-naturlig kodet aminosyre. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, kan én eller flere aminosyresubstitusjoner i FGF-21 polypeptidet være med én eller flere naturlig forekommende aminosyrer, og i tillegg er minst én substitusjon med en ikke-naturlig kodet aminosyre.

I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyren en karbonylgruppe, en acetylgruppe, en aminooksygruppe, en hydrazingruppe, en hydrazidgruppe, en semikarbazidgruppe, en azidgruppe eller en alkyngruppe.

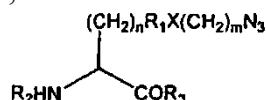
I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyren en karbonylgruppe. I noen utførelsesformer, har den ikke-naturlig kodede aminosyren strukturen:



hvor  $n$  er 0-10;  $\text{R}_1$  er en alkyl, aryl, substituert alkyl eller substituert aryl;  $\text{R}_2$  er H, en alkyl, aryl, substituert alkyl og substituert aryl; og  $\text{R}_3$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en aminotermus modifikasjonsgruppe, og  $\text{R}_4$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en karboksyterminus modifikasjonsgruppe.

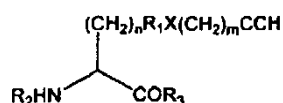
I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyren en aminooksygruppe. I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyren en hydrazidgruppe. I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyren en hydrazingruppe. I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyreresten en semikarbazidgruppe.

I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyreresten en azidgruppe. I noen utførelsesformer, har den ikke-naturlig kodede aminosyren strukturen:



hvor  $n$  er 0-10;  $\text{R}_1$  er en alkyl, aryl, substituert alkyl, substituert aryl eller ikke foreliggende;  $\text{X}$  er O, N, S eller ikke foreliggende;  $m$  er 0-10;  $\text{R}_2$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en aminotermus modifikasjonsgruppe, og  $\text{R}_3$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en karboksyterminus modifikasjonsgruppe.

I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyren en alkyngruppe. I noen utførelsesformer, har den ikke-naturlig kodede aminosyren strukturen:



hvor  $n$  er 0-10;  $\text{R}_1$  er en alkyl, aryl, substituert alkyl eller substituert aryl;  $\text{X}$  er O, N, S eller ikke foreliggende;  $m$  er 0-10,  $\text{R}_2$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en

aminoterminus modifikasjonsgruppe, og  $R_3$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en karboksyterminus modifikasjonsgruppe.

I noen utførelsesformer av redegjørelsen er polypeptidet en FGF-21 polypeptid-agonist, delvis agonist, antagonist, delvis antagonist eller invers agonist. I noen utførelsesformer av redegjørelsen omfatter FGF-21 polypeptid-agonisten, delvis agonisten, antagonist, delvis antagonist eller invers agonisten en ikke-naturlig kodet aminosyre knyttet til en vannløselig polymer. I noen utførelsesformer, omfatter den vannløselige polymeren en poly(etylenglykol)andel. I noen utførelsesformer av redegjørelsen omfatter FGF-21 polypeptid-agonisten, delvis agonisten, antagonist, delvis antagonist eller invers agonisten en ikke-naturlig kodet aminosyre og én eller flere post-translasjonell modifikasjon, linker, polymer eller biologisk aktivt molekyl.

Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også isolerte nukleinsyrer omfattende et polynukleotid som hybridiserer under strenge betingelser til SEKV ID NR: 8-14. Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også isolerte nukleinsyrer omfattende et polynukleotid som hybridiserer under strenge betingelser til SEKV ID NR: 8-14 hvori polynukleotidet omfatter minst ett selektorkodon. Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også isolerte nukleinsyrer omfattende et polynukleotid som koder for polypeptidene vist som SEKV IDer NR.: 1-7. Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også isolerte nukleinsyrer omfattende et polynukleotid som koder for polypeptidene vist som SEKV IDer NR.: 1-7 med én eller flere ikke-naturlig kodete aminosyrer. Det er lett åpenbart for fagpersonene at flere forskjellige polynukleotider kan kode for et hvilket som helst polypeptid ifølge foreliggende oppfinnelse.

I noen utførelsesformer er selektorkodonet valgt fra gruppen bestående av et amberkodon, ochrekodon, opalkodon, et unikt kodon, et sjeldent kodon, et fem-base-kodon og et fire-base-kodon.

Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også fremgangsmåter for fremstilling av et FGF-21 polypeptid knyttet til en vannløselig polymer. I noen utførelsesformer, omfatter fremgangsmåten å bringe et isolert FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre i kontakt med en vannløselig polymer omfattende en andel som reagerer med den ikke-naturlig kodete aminosyren. I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig kodete aminosyren inkorporert inn i FGF-21 polypeptidet reaktivt overfor en vannløselig polymer som ellers er ureaktiv mot en hvilken som helst av de 20 vanlige aminosyrene. I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig kodete aminosyren inkorporert inn i FGF-21 polypeptidet reaktiv mot en linker, polymer eller biologisk aktivt molekyl som ellers er ureaktivt overfor en hvilken som helst av de 20 vanlige aminosyrene.

I noen utførelsesformer blir FGF-21 polypeptidet knyttet til den vannløselige polymeren dannet ved å reagere et FGF-21 polypeptid omfattende en karbonyl-holdig aminosyre med et poly(etylenglykol)molekyl omfattende en aminooksy-, hydrazin-, hydrazid- eller semikarbazidgruppe. I noen utførelsesformer er aminooksy-, hydrazin-,

hydrazid- eller semikarbazidgruppen knyttet til poly(etylenglykol)molekylet ved en amidbinding.

I noen utførelsesformer blir FGF-21 polypeptidet knyttet til den vannløselige polymeren dannet ved å reagere et poly(etylenglykol)molekyl omfattende en  
5 karbonylgruppe med et polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre som omfatter en aminooksy-, hydrazin-, hydrazid- eller semikarbazidgruppe.

I noen utførelsesformer blir FGF-21 polypeptidet knyttet til den vannløselige polymeren dannet ved å reagere et FGF-21 polypeptid omfattende en alkyn-holdig aminosyre med et poly(etylenglykol)molekyl omfattende en azid-andel. I noen  
10 utførelsesformer er azid- eller alkyngruppen knyttet til poly(etylenglykol)molekylet ved en amidbinding.

I noen utførelsesformer, blir FGF-21 polypeptidet knyttet til den vannløselige polymeren dannet ved å reagere et FGF-21 polypeptid omfattende en azid-holdig aminosyre med et poly(etylenglykol)molekyl omfattende en alkyn-andel. I noen  
15 utførelsesformer er azid- eller alkyngruppen knyttet til poly(etylenglykol)molekylet ved en amidbinding.

I noen utførelsesformer har poly(etylenglykol)molekylet en molekylvekt på mellom omkring 0,1 kDa og omkring 100 kDa. I noen utførelsesformer har poly(etylenglykol)molekylet en molekylvekt på mellom 0,1 kDa og 50 kDa.

20 I noen utførelsesformer er poly(etylenglykol)molekylet en forgrenet polymer. I noen utførelsesformer, har hver forgrening av den poly(etylenglykol) forgrenede polymeren en molekylvekt på mellom 1 kDa og 100 kDa, eller mellom 1 kDa og 50 kDa.

I noen utførelsesformer, omfatter den vannløselige polymeren knyttet til FGF-21 polypeptidet en polyalkylenglykol-andel. I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-  
25 naturlig kodede aminosyreresten inkorporert inn i FGF-21 polypeptidet en karbonylgruppe, en aminooksygruppe, en hydrazidgruppe, en hydrazin-, en semikarbazidgruppe, en azidgruppe eller en alkyngruppe. I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyreresten inkorporert inn i FGF-21 polypeptidet en karbonyl-andel og den vannløselige polymeren omfatter en aminooksy-, hydrazid-, hydrazin- eller semikarbazid-  
30 andel. I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyreresten inkorporert inn i FGF-21 polypeptidet en alkyn-andel og den vannløselige polymeren omfatter en azid-andel. I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyreresten inkorporert inn i FGF-21 polypeptidet en azid-andel og den vannløselige polymeren omfatter en alkyn-andel.

35 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også sammensetninger omfattende et FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre og en farmasøytisk akseptabel bærer. I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig kodede aminosyren knyttet til en vannløselig polymer.



Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også celler omfattende et polynukleotid som koder for FGF-21 polypeptidet omfattende et selektorkodon. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter cellene en ortogonal RNA syntetase og/eller en ortogonal tRNA for å substituere en ikke-naturlig kodet aminosyre inn i FGF-21 polypeptidet.

5 Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også fremgangsmåter for fremstilling av et FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter fremgangsmåtene kultivering av celler omfattende et polynukleotid eller polynukleotider som koder for et FGF-21 polypeptid, en ortogonal RNA syntetase og/eller en ortogonal tRNA under betingelser for å tillate ekspresjon av  
10 FGF-21 polypeptidet; og rense FGF-21 polypeptidet fra cellene og/eller kulturmediet.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også fremgangsmåter for å øke terapeutisk halveringstid, serum-halveringstid eller sirkuleringstid av FGF-21 polypeptider. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også fremgangsmåter for å modulere immuno-  
15 genisitet av FGF-21 polypeptider. I noen utførelsesformer, omfatter fremgangsmåtene å substituere en ikke-naturlig kodet aminosyre for én aminosyre i naturlig forekommende FGF-21 polypeptider ved posisjon 108 (SEKV ID NR.:1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7) og/eller å knytte FGF-21 polypeptidet til en linker, en polymer, en vannløselig polymer; eller et biologisk aktivt molekyl.

Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også fremgangsmåter for behandling av en  
20 pasient med behov for slik behandling med en effektiv mengde av et FGF-21 molekyl ifølge foreliggende oppfinnelse. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter fremgangsmåtene administrering til pasienten av en terapeutisk-effektiv mengde av en farmasøytisk sammensetning omfattende et FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig-kodet aminosyre og en farmasøytisk akseptabel bærer. Den ikke-naturlig kodede  
25 aminosyren er knyttet til en vannløselig polymer.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også FGF-21 polypeptider omfattende en sekvens vist i SEKV ID NR: 1-7 eller en hvilken som helst annen FGF-21 polypeptid-  
30 sekvens, unntatt at én aminosyre er substituert ved en ikke-naturlig kodet aminosyre ved posisjon 108 (SEKV ID NR.:1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også FGF-21 polypeptider omfattende en sekvens vist som SEKV ID NR: 1, 2, 4 og 5. I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig kodede aminosyren knyttet til en vannløselig polymer. I noen utførelsesformer omfatter den vannløselige polymeren en poly(etylenglykol)andel. I noen utførelsesformer omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyren en karbonylgruppe, en aminooksygruppe, en  
35 hydrazidgruppe, en hydrazingruppe, en semikarbazidgruppe, en azidgruppe eller en alkylgruppe.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også farmasøytiske sammensetninger omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer og et FGF-21 polypeptid omfattende sekvensen vist i SEKV ID NR: 1-7 eller en hvilken som helst annen FGF-21

polypeptidsekvens, hvori én aminosyre er substituert ved en ikke-naturlig kodet aminosyre ved posisjon 108 (SEKV ID NR.:1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også farmasøytiske sammen-  
setninger omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer og et FGF polypeptid omfattende  
5 sekvensen vist i SEKV ID NR: 1-7 unntatt at én aminosyre ved posisjon 108 (SEKV ID NR:1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7) er substituert ved en ikke-naturlig kodet aminosyre. I noen utførelsesformer, omfatter den ikke-naturlig kodede aminosyren en sakkarid-andel. I noen utførelsesformer er den vannløselige polymeren knyttet til polypeptidet via en sakkarid-andel. I noen utførelsesformer er en linker,  
10 polymer eller biologisk aktivt molekyl knyttet til FGF-21 polypeptidet via en sakkarid-andel.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også et FGF-21 polypeptid omfattende en vannløselig polymer knyttet ved en kovalent binding til FGF-21 polypeptidet ved en enkelt aminosyre. I noen utførelsesformer, omfatter den vannløselige polymeren en  
15 poly(etylenglykol)andel. Aminosyren kovalent knyttet til den vannløselige polymeren er en ikke-naturlig kodet aminosyre som foreligger i polypeptidet.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et FGF-21 polypeptid omfattende minst én linker, polymer eller biologisk aktivt molekyl, hvori nevnte linker, polymer eller biologisk aktive molekyl er festet til polypeptidet gjennom en funksjonell gruppe av en ikke-  
20 naturlig kodet aminosyre ribosomalt inkorporert inn i polypeptidet. I noen utførelsesformer er polypeptidet monoPEGylert. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også et FGF-21 polypeptid omfattende en linker, polymer eller biologisk aktivt molekyl som er festet til én ikke-naturlig kodet aminosyre hvori nevnte ikke-naturlig kodede aminosyre er ribosomalt inkorporert i polypeptidet ved forhåndsvalgte seter.

Inkludert innen omfanget av denne oppfinnelsen er FGF-21 leder- eller signalsekvensen sammenføydd til en FGF-21 kodende region, så vel som en heterolog signalsekvens sammenføydd til en FGF-21 kodende region. Den valgte heterologe leder- eller signalsekvensen skulle være én som blir gjenkjent og prosessert, f.eks. ved  
25 vertscellesekresjonssystem for å utsondre og muligens spaltet ved en signalpeptidase, ved vertscellen. Ledersekvenser ifølge foreliggende redegjørelse kan bli valgt fra de følgende: tre-leucin-lederen fra SEKV ID NR: 3 og SEKV ID NR: 6 (aminosyreposisjoner 1-28), to-leucin-lederen fra SEKV ID NR: 4 og SEKV ID NR: 7 (aminosyreposisjoner 1-27), His-taggen fra SEKV ID NR: 2 (aminosyreposisjoner 1-10), SEKV ID NR: 39, SEKV ID NR: 40, SEKV ID NR: 41, SEKV ID NR: 42, SEKV ID NR: 43, SEKV ID NR: 44. En  
35 fremgangsmåte for behandling av en tilstand eller lidelse med FGF-21-en ifølge foreliggende oppfinnelse er ment å innebære behandling med FGF-21 med eller uten et signal- eller lederpeptid.

Foreliggende redegjørelse tilveiebringer også fremgangsmåter for å indusere en økning i glukoseopptak i adipocytter, nevnte fremgangsmåte omfatter å administrere

FGF-21 til nevnte celler i en mengde som er effektiv til å indusere en økning i glukoseopptak. Nevnte økning i glukoseopptak kan forårsake en økning i energiforbruk ved raskere og mer effektiv glukoseutnyttelse.

I en annen utførelsesform, vil konjugering av FGF-21 polypeptidet omfattende én ikke-naturlig forekommende aminosyre til et annet molekyl, inkludert men ikke begrenset til PEG, tilveiebringe hovedsakelig rensset FGF-21 på grunn av den unike kjemiske reaksjonen utnyttet for konjugering til den ikke-naturlige aminosyren. Konjugering av FGF-21 omfattende én ikke-naturlig kodet aminosyrer til et annet molekyl, så som PEG, kan bli utført med andre rensseteknikker utført før eller etter konjugeringstrinnet for å tilveiebringe hovedsakelig rent FGF-21.

#### KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 - Ambermutasjoner i FGF-21 og tilsvarende seter i FGF-19 er vist.

Figur 2 - Strukturen av human FGF-19 er vist.

Figur 3 - Ambermutasjoner i FGF-21 og tilsvarende seter i FGF-2 er vist.

Figur 4 - Strukturen av human FGF-19 er vist.

Figur 5 - Ekspresjon av N-terminal His-tagget FGF-21 og supresjon ved 7 amberseter er vist.

Figur 6 – BPER-supernatantprøver fra ekspresjonen av N-terminal His-tagget FGF-21 og supresjon ved 7 amberseter er vist.

Figur 7a - SigmaPlot som beregner EC50 verdiene for serielle fortyninger av FGF21 varianter 30K PEG-391, 30K PEG-477, 30K PEG-R131, 30K PEG-Q108, HIS-FGF21 (His-tagget vill-type).

Figur 7b - En tabell som viser det gjennomsnittlige foldetap av aktivitet for hver av de listede PEGylerte FGF21 variantene.

Figur 8 - En SDS-PAGE analyse av ikke-His-tagget FGF-21 uttrykt i *E. coli*.

Figur 9 - (En) SDS-PAGE analyse av FGF-21-Y83pAF elueringsfraksjoner. (B) Kromatogram av Q HP eluering av utagget FGF-21-Y83pAF. (C) SDS-PAGE analyse av FGF-21-Y832pAFQ HP elueringspool.

Figur 10 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 11 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 12 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 13 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 14 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 15 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 16 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

5 Figur 17 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 18 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

10 Figur 19 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 20 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 21 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

15 Figur 22 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 23 - Data fra eksempel 28, Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter.

Figur 24 - pVK10-FGF21 vektorkart.

20 Figur 25 - pVK10-FGF21 vektorsekvens.

Figur 26a - Serumkonsentrasjon-tid profiler av tre doser av N-6His WT FGF21 i rotter. Rotter ble gitt en enkelt administrasjon av testartikkel subkutant. N= 4 dyr per gruppe. Symboler indikerer middelverdier av målte serumkonsentrasjoner, feilstolper indikerer standardavvik.

25 Figur 26b - Serumkonsentrasjon-tid profiler av N-6His WT FGF21 dosert enten subkutant eller intravenøst ved 0,25 mg/kg. Rotter ble gitt en enkelt administrasjon av testartikkel subkutant. N= 4 dyr per gruppe. Symboler indikerer middelverdier av målte serumkonsentrasjoner, feilstolper indikerer standardavvik. Total biologisk tilgjengelighet er ~87 %

30 Figur 27a - Doseforhold til serumkonsentrasjon av testartikkel ved Cmaks. Cmaks verdier blir rapportert som observert, ikke teoretisk. N=4 dyr per behandlingsgruppe. Lineær-regresjonsverdien er 0,59 med en stigning på  $348,5 \pm 91,22$ .

Figur 27b - Doseforhold til terminal halveringstid av testartikkel. N=4 dyr per behandlingsgruppe. Lineær-regresjonsverdien kunne ikke bli beregnet på grunn av en  
35 tilsynelatende metning av clearance over 0,25 mg/kg.

Figur 27c - Doseforhold til serumkonsentrasjon AUC. AUC verdier blir rapportert som observert beregnet til uendelighet. N=4 dyr per behandlingsgruppe. Lineær-regresjonsverdien er 0,75 med en stigning på  $1079 \pm 194,1$

Figur 28a - Serumkonsentrasjon-tid profiler av tre doser av PP WT FGF21 i rotter. Rotter ble gitt en enkelt administrasjon av testartikkel subkutan. N= 4 dyr per gruppe. Symboler indikerer middelverdier av målte serumkonsentrasjoner, feilstolper indikerer standardfeil.

5 Figur 28b - Serumkonsentrasjon-tid profiler av PP WT FGF21 dosert enten subkutan eller intravenøst ved 0,25 mg/kg. Rotter ble gitt en enkelt administrasjon av testartikkel subkutan. N= 4 dyr per gruppe. Symboler indikerer middelverdier av målte serumkonsentrasjoner, feilstolper indikerer standardfeil. Den totale biologiske tilgjengeligheten er ~65 %

10 Figur 29a - Doseforhold til serumkonsentrasjon av testartikkel ved  $C_{max}$ .  $C_{max}$  verdier blir rapportert som observert ikke teoretisk. N=4 dyr per behandlingsgruppe. Lineær-regresjonsverdien er 0,92 med en stigning på  $454,2 \pm 42,42$ .

15 Figur 29b - Doseforhold til terminal halveringstid av testartikkel. N=4 dyr per behandlingsgruppe. Lineær-regresjonsverdien kunne ikke bli beregnet på grunn av en tilsynelatende metning av clearance over 0,125 mg/kg.

Figur 29c - Doseforhold til serumkonsentrasjon AUC. AUC-verdier blir rapportert som observert beregnet til uendelighet. N=4 dyr per behandlingsgruppe. Lineær-regresjonsverdien er 0,93 med en stigning på  $1585 \pm 137,1$

20 Figur 30a - Sammenligning av beregnet terminal halveringstid for PP versus N6-His WT FGF21 forbindelser dosert ved 0,5 mg/kg subkutan i rotter. Den beregnede p-verdien ved anvendelse av en to-halet t-test er 0,7715. N=3-4 dyr per gruppe

Figur 30b - Sammenligning av  $C_{max}$  verdier for PP versus N6-His WT FGF21 forbindelser dosert ved 0,5 mg/kg subkutan i rotter. Den beregnede p-verdien ved anvendelse av en to-halet t-test er 0,7652. N=3-4 dyr per gruppe

25 Figur 30c - Sammenligning av  $AUC_{inf}$  for PP versus N6-His WT FGF21 forbindelser dosert ved 0,5 mg/kg subkutan i rotter. Den beregnede p-verdien ved anvendelse av en to-halet t-test er 0,4372

Figur 31a - PK profiler av ti PEGylerte N6-His taggede FGF21 isomerer.

30 Figur 31b - Absorpsjonsprofiler for PEGylerte FGF21 isomerer etter 0,25 mg/kg subkutan injeksjon.

Figur 31c - Elimineringsprofiler for PEGylerte FGF21 isomerer etter 0,25 mg/kg subkutan injeksjon.

Figur 32 - Farmakokinetisk sammenligning av 20 og 30 kDa PEGylering.

35 Figur 33 - Plasmakonsentrasjon tid kurver for rotter dosert enten intravenøst eller subkutan med 0,25 mg/kg 20KPEG-pAF91(N6-His)FGF21. En enkelt dose ble administrert til hvert dyr. N=4 dyr per gruppe. Symboler indikerer middelverdier av målte plasmakonsentrasjoner, stolper indikerer standardavvik. Total biologisk tilgjengelighet er ~30 %.

Figur 34 - To geler som viser sekresjonen av FGF21 i *e.coli* og visning av lederne brukt at OmpA, MalE og StII fungerte svært bra, som bevist ved den periplasmisk frigivelse løselige fraksjonen i den andre gelen.

## 5 DEFINISJONER

Det skal bli forstått at denne oppfinnelsen ikke er begrenset til den spesielle metodologi, protokoller, cellelinjer, konstrukter og reagenser beskrevet heri og kan som sådan variere. Det skal også bli forstått at terminologien brukt heri bare er for formålet å beskrive spesielle utførelsesformer, og ikke er tenkt å begrense omfanget av foreliggende oppfinnelse, som bare vil være begrenset ved de vedlagte kravene.

Som brukt heri og i de vedlagte kravene, inkluderer entallsformene "en," "et," og "den/det" flertallsreferanse med mindre konteksten tydelig indikerer noe annet. Derfor er for eksempel, referanse til en "FGF-21" eller "FGF-21 polypeptid" en referanse til ett eller flere slike proteiner og inkluderer ekvivalenter derav kjent for fagpersonene, og så videre.

Med mindre noe annet er definert, har alle tekniske og vitenskapelige begreper brukt heri den samme betydningen som vanligvis forstått av en fagperson innen faget denne oppfinnelsen tilfører. Selv om hvilke som helst fremgangsmåter, anordninger og materialer lignende eller ekvivalente med de beskrevet heri kan bli brukt i den praktiske utførelse eller testing av oppfinnelsen, blir de foretrukne fremgangsmåter, anordninger og materialer nå beskrevet.

Alle publikasjoner og patenter nevnt heri er for det formål å beskrive og vise, for eksempel, konstruktene og metodologier som er beskrevet i publikasjonene, som kunne bli brukt i forbindelse med den herværende beskrevne oppfinnelsen. Publikasjonene diskutert heri er tilveiebrakt utelukkende for deres offentliggjøring før innleveringsdatoen for foreliggende søknad. Ikke noe heri skal bli betraktet som en innrømmelse av at oppfinnerne ikke er berettiget til å antedatere slik offentliggjøring i kraft av tidligere oppfinnelse eller en hvilken som helst annen årsak.

Begrepet "hovedsakelig rensset" angir et FGF-21 polypeptid som kan være hovedsakelig eller vesentlig uten komponenter som normalt ledsager eller vekselvirker med proteinet som funnet i sitt naturlig forekommende miljø, dvs. en naturlig celle eller vertscelle i tilfellet med rekombinant produserte FGF-21 polypeptider. FGF-21 polypeptid som kan være hovedsakelig uten cellulært materiale inkluderer preparater av protein som har mindre enn omkring 30 %, mindre enn omkring 25 %, mindre enn omkring 20 %, mindre enn omkring 15 %, mindre enn omkring 10 %, mindre enn omkring 5 %, mindre enn omkring 4 %, mindre enn omkring 3 %, mindre enn omkring 2 % eller mindre enn omkring 1 % (av tørr vekt) av forurensende protein. Når FGF-21 polypeptidet eller variant derav blir rekombinant produsert ved vertscellene, kan proteinet foreligge ved omkring 30 %, omkring 25 %, omkring 20 %, omkring 15 %, omkring 10 %, omkring 5 %, omkring 4 %, omkring 3 %, omkring 2 %, eller omkring 1 % eller mindre av den tørre

vekten av cellene. Når FGF-21 polypeptidet eller variant derav blir rekombinant produsert ved vertscellene, kan proteinet foreligge i kulturmediet ved omkring 5 g/l, omkring 4 g/l, omkring 3 g/l, omkring 2 g/l, omkring 1 g/l, omkring 750 mg/l, omkring 500 mg/l, omkring 250 mg/l, omkring 100 mg/l, omkring 50 mg/l, omkring 10 mg/l eller omkring 1 mg/l eller mindre av den tørre vekten av cellene. Derfor kan "hovedsakelig rensset" FGF-21 polypeptid som produsert ved fremgangsmåtene ifølge foreliggende redegjørelse ha et renhetsnivå på minst omkring 30 %, minst omkring 35 %, minst omkring 40 %, minst omkring 45 %, minst omkring 50 %, minst omkring 55 %, minst omkring 60 %, minst omkring 65 %, minst omkring 70 %, spesifikt et renhetsnivå på minst omkring 75 %, 80 %, 85 %, og mer spesifikt, et renhetsnivå på minst omkring 90 %, et renhetsnivå på minst omkring 95 %, et renhetsnivå på minst omkring 99 % eller større som bestemt ved passende fremgangsmåter så som SDS/PAGE analyse, RP-HPLC, SEC og kapillær elektroforese.

En "rekombinant vertscelle" eller "vertscelle" angir en celle som inkluderer et eksogent polynukleotid, uavhengig av fremgangsmåten brukt for insersjon, for eksempel, direkte opptak, transduksjon, f-paring eller andre fremgangsmåter kjent innen faget for å danne rekombinante vertsceller. Det eksogene polynukleotidet kan bli opprettholdt som en ikke-integrert vektor, for eksempel, et plasmid, eller kan alternativt være integrert inn i vertsgenomet.

Som brukt heri, inkluderer begrepet "medium" eller "medier" et hvilket som helst kulturmedium, løsning, faststoff, halv-faststoff eller stiv bærer som kan bære eller inneholde en hvilken som helst vertscelle, inkludert bakterielle vertsceller, gjærvertsceller, insekt-vertsceller, plante-vertsceller, eukaryotiske vertsceller, mammalske vertsceller, CHO-celler, prokaryotiske vertsceller, *E. coli* eller *Pseudomonas* vertsceller, og celleinnhold. Derfor kan begrepet innbefatte medium hvor vertscellen har blitt dyrket, f.eks. medium som FGF-21 polypeptidet har blitt utsondret til, inkludert medium enten før eller etter et proliferasjonstrinn. Begrepet også kan innbefatte buffere eller reagenser som inneholder vertscellelysater, så som i tilfellet hvor FGF-21 polypeptidet blir produsert intracellulært og vertscellene blir lysert eller brutt ned for å frigi FGF-21 polypeptidet.

"Reduksjonsmiddel," som brukt heri med hensyn til protein refolding, er definert som en hvilken som helst forbindelse eller materiale som opprettholder sulfhydrylgrupper i den reduserte tilstanden og reduserer intra- eller intermolekylære disulfidbindinger. Egnede reduksjonsmidler inkluderer, men er ikke begrenset til, ditioneitol (DTT), 2-merkaptoetanol, ditioerytritol, cystein, cysteamin (2-aminoetantol) og redusert glutation. Det er lett åpenbart for fagpersonene at en lang rekke reduksjonsmidler er egnet for bruk i fremgangsmåtene og sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse.

"Oksidasjonsmiddel," som brukt heri med hensyn til proteinrefolding, er definert som en hvilken som helst forbindelse eller materiale som er i stand til å fjerne et elektron fra en forbindelse som blir oksidert. Egnede oksidasjonsmidler inkluderer, men er ikke

begrenset til, oksidert glutation, cystin, cystamin, oksidert ditiotreitol, oksidert erytreitol og oksygen. Det er lett åpenbart for fagpersonene at en lang rekke oksidasjonsmidler er egnet for bruk i fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Begrepet "anti-diabetisk middel" skal bety et hvilket som helst legemiddel som er nyttig i behandling, forhindring eller på annen måte redusere alvorlighetsgraden av en hvilken som helst glukosemetabolismelidelse, eller hvilke som helst komplikasjoner derav, inkludert hvilke som helst av betingelsene, sykdommene eller komplikasjonene beskrevet heri. Anti-diabetiske midler inkluderer insulin, tiazolidindioner, sulfonylureaer, benzosyrederivater, alfa-glukosidaseinhibitorer eller lignende. Andre generelle kategorier av anti-diabetiske midler som kan være del av en underlagt sammensetning inkluderer (med definerte begreper i anførselstegn): "legemiddelartikler" anerkjent i den offisielle United States Pharmacopoeia eller offisielle National Formulary (eller et hvilket som helst tillegg til disse); "nytt legemiddel" og "nytt dyrelegemiddel" godkjent av FDA i U.S. slik de begrepene er brukt i Title 21 i the United States Code; et hvilket som helst legemiddel som krever godkjennelse av en myndighetsenhet, i U.S.A. eller utlandet ("godkjent legemiddel"); et hvilket som helst legemiddel som det er nødvendig å oppnå regulatorisk godkjennelse for, for å etterkomme 21 U.S.C. §355(a) ("regulatorisk godkjent legemiddel"); et hvilket som helst middel som er eller ble underkastet en humanlegemiddel-søknad under 21 U.S.C. §379(g) ("humant legemiddel"). (Alle referanser til lovsamling for denne definisjonen refererer til slik lov som på den opprinnelige innleveringsdatoen for denne søknaden.) Andre anti-diabetiske midler er vist heri, og er kjent for fagpersonene. Det er foretrukket at de antidiabetiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen, som brukt heri, er i stand til å redusere HbA1c nivåer ved minst en 10 % endring fra grunnlinjen, og det er mer spesielt foretrukket at de anti-diabetiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen, som brukt heri, er i stand til å redusere HbA1c nivåer med minst en 50 % endring fra grunnlinjen. Antidiabetiske midler inkluderer insulinpotensiatorer, så som inkludert men ikke begrenset til, lite molekyl insulinpotensiatorer, taurin, alfa liponsyre, en ekstrakt av morbær, krom, glutamin, *Enicostemma littorale* Blume, *Scoparia dulcis*, en ekstrakt av estragon, *andrographis paniculata*, isomaltose, trehalose eller D-mannose som kan potensierte sekresjonen eller aktiviteten av insulin ytterligere.

"Denatureringsmiddel" eller "denaturant," som brukt heri, er definert som en hvilken som helst forbindelse eller materiale som vil forårsake en reversibel utfolding av et protein. Styrken av et denatureringsmiddel eller denaturant vil bli bestemt både ved egenskapene og konsentrasjonen av det spesielle denatureringsmidlet eller denaturanten. Egnede denatureringsmidler eller denaturanter kan være kaotroper, detergenter, organiske løsemidler, vannblandbare løsemidler, fosfolipider eller en kombinasjon av to eller flere slike midler. Egnede kaotroper inkluderer, men er ikke begrenset til, urea, guanidin og natrium tiocyanat. Nyttige detergenter kan inkludere, men er ikke begrenset til, sterke detergenter så som natriumdodekylsulfat eller polyoksyetylenetere (f.eks. Tween- eller



Triton-detergenter), Sarkosyl, milde ikke-ioniske detergenter (f.eks. digitonin), milde kationiske detergenter så som N->2,3-(dioleyoksy)-propyl-N,N,N-trimetylammonium, milde ioniske detergenter (f.eks. natriumkolat eller natriumdeoksykolat) eller zwitter-ioniske detergenter inkludert, men ikke begrenset til, sulfobetainer (Zwittergent), 3-(3-cholamidopropyl)dimetylammonio-1-propan sulfat (CHAPS) og 3-(3-cholamidopropyl)-  
5 dimetylammonio-2-hydroksey-1-propan sulfonat (CHAPSO). Organiske, vannblandbare løsemidler så som acetonitril, lavere alkanoler (spesielt C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> alkanoler så som etanol eller isopropanol), eller lavere alkandioler (spesielt C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> alkandioler så som etylen-glykol) kan bli brukt som denaturanter. Fosfolipider nyttige i foreliggende oppfinnelse  
10 kan være naturlig forekommende fosfolipider så som fosfatidyletanolamin, fosfatidylkolin, fosfatidylserin og fosfatidylinositol eller syntetiske fosfolipidderivater eller varianter så som diheksanoylfosfatidylkolin eller diheptanoylfosfatidylkolin.

"Refolding," som brukt heri beskriver en hvilken som helst prosess, reaksjon eller fremgangsmåte som transformerer disulfidbinding-holdige polypeptider fra en feilaktig  
15 foldet eller ufoldet tilstand til en naturlig eller riktig foldet konformasjon med hensyn til disulfidbindinger.

"Kofolding," som brukt heri, refererer spesifikt til refoldingsprosesser, reaksjoner, eller fremgangsmåter som anvender minst to polypeptider som vekselvirker med  
20 hverandre og resulterer i transformasjonen av ufoldede eller feilaktig foldede polypeptider til naturlige, riktig foldede polypeptider.

Som brukt heri, skal "FGF-21 polypeptid," "fibroblastvekstfaktor 21" eller "FGF-21" og ikke-orddelte former derav inkludere de polypeptidene og proteinene som har  
minst én biologisk aktivitet av en fibroblastvekstfaktor 21, så vel som FGF-21 analoger, FGF-21 isoformer, FGF-21 mimetika, FGF-21 fragmenter, hybride FGF-21 proteiner,  
25 fusjonsproteiner, oligomerer og multimerer, homologer, glykosyleringsmønstervarianter, varianter, spleisevarianter og muteiner derav, uavhengig av den biologiske aktiviteten av de samme, og videre uavhengig av fremgangsmåten for syntese eller tilvirkning derav inkludert, men ikke begrenset til, rekombinant (enten det er produsert fra cDNA, genomisk DNA, syntetisk DNA eller annen form for nukleinsyre), in vitro, in vivo, ved  
30 mikroinjeksjon av nukleinsyremolekyler, syntetiske, transgene og genaktiverte fremgangsmåter. Begrepet "FGF-21 polypeptid" og "FGF-21" innbefatter FGF-21 polypeptider omfattende én eller flere aminosyresubstitusjoner, addisjoner eller delesjoner.

Substitusjoner i en lang rekke aminosyreposisjoner i naturlig-forekommende FGF-  
35 21 har blitt beskrevet. Substitusjoner inkluderer men ikke begrenset til, de som modulerer farmasøytisk stabilitet, øker agonistaktivitet, øker proteaseresistens, omformer polypeptidet til en antagonist, etc. og er omspent av begrepet " FGF-21 polypeptid" eller "FGF-21."

For sekvenser av FGF-21 som mangler en ledersekvens, se SEKV ID NR: 1, SEKV ID NR: 2 og SEKV ID NR: 5 heri. For sekvenser av FGF-21 med en ledersekvens, se SEKV ID NR: 3, SEKV ID NR: 4, SEKV ID NR: 6 og SEKV ID NR: 7 heri. I noen utførelsesformer er FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen hovedsakelig identiske til SEKV IDer NR: 1-7 unntatt at én aminosyre ved posisjon 108 (SEKV ID NR: 1 eller de 5 tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7) er substituert ved en ikke-naturlig kodet aminosyre eller en hvilken som helst annen sekvens av et FGF-21 polypeptid. Mange polymorfismer av FGF-21 har blitt identifisert. Leucin eller prolin har blitt beskrevet ved den samme posisjonen i U.S. patentpublikasjon nr. 20010012628 og U.S. patent nr. 6,716,626. N-terminale leder- eller signalsekvenser som avviker ved 1 aminosyre (leucin) 10 er vist i U.S. patent nr. 6,716,626 og U.S. patentpublikasjon nr. 20040259780. Nukleinsyremolekyler som koder for FGF-21 og FGF-21 polypeptider inkludert mutanter og fremgangsmåter for å uttrykke og rense FGF-21 polypeptider er velkjent og inkluderer, men er ikke begrenset til, de vist i U.S. patent nr. 6,716,626; U.S. patentpublikasjoner nr. 15 2005/0176631, 2005/0037457, 2004/0185494, 2004/0259780, 2002/0164713, og 2001/0012628; WO 01/36640; WO 03/011213; WO 03/059270; WO 04/110472; WO 05/061712; WO 05/072769; WO 05/091944; WO 05/113606; WO 06/028595; WO 06/028714; WO 06/050247; WO 06/065582; WO 06/078463.

Begrepet "FGF-21 polypeptid" inkluderer også de farmasøytisk akseptable saltene 20 og prodrugene, og prodruger av saltene, polymorfer, hydrater, solvater, biologisk-aktive fragmenter, biologisk aktive varianter og stereoisomerer av den naturlig-forekommende FGF-21 så vel som agonist, mimetisk og antagonist-varianter av den naturlig-forekommende FGF-21 og polypeptidfusjoner derav. Fusjoner omfattende ytterligere aminosyrer ved aminoterminusen, karboksylterminusen, eller begge, er omspent av 25 begrepet "FGF-21 polypeptid." Eksempelvis fusjoner inkluderer, men er ikke begrenset til, f.eks. metionyl FGF-21 i hvilket et metionin er knyttet til N-terminusen av FGF-21 som resulterer fra den rekombinante ekspresjonen av den modne formen av FGF-21 som mangler leder- eller signalpeptidet eller del derav (et metionin er knyttet til N-terminusen av FGF-21 som resulterer fra den rekombinante ekspresjonen), fusjoner for formålet 30 rensing (inkludert, men ikke begrenset til, poly-histidin eller affinitetsepitoper), fusjoner med serumalbumin-bindende peptider og fusjoner med serumproteiner så som serumalbumin. U.S. patent nr. 5,750,373 beskriver en fremgangsmåte for å velge nye proteiner så som veksthormon og antistoff-fragmentvarianter som har endrede bindende egenskaper for deres respektive reseptormolekyler. Fremgangsmåten omfatter 35 kondensering av et gen som koder for et interessant protein til det karboksyterminale domenet av gen III coat protein av den filamentøse fag M13. Kimære molekyler omfattende FGF-21 og ett eller flere andre molekyler, inkludert men ikke begrenset til, keratinocytvekstfaktor (KGF) kan bli generert (Reich-Slotky, R. et al., J. Biol. Chem. 270:29813-29818 (1995)). Det kimære molekylet kan inneholde spesifikke regioner eller

fragmenter av den ene eller begge av FGF-21 og KGF molekylene. Hvilke som helst slike fragmenter kan bli fremstilt fra proteinene ved standard biokjemiske metoder, eller kan ved å uttrykke et polynukleotid som koder for fragmentet. FGF-21, eller et fragment derav, bli produsert som et fusjonsprotein omfattende humant serumalbumin (HSA) eller en del derav. Slike fusjonskonstrukturer er egnet for å forsterke ekspresjon av FGF-21, eller fragmentet derav, i en eukaryotisk vertscelle. Eksempelvis HSA-deler inkluderer det N-terminale polypeptidet (aminosyrene 1-369, 1-419, og intermediære lengder som starter med aminosyre 1), som vist i U.S. pat. nr. 5,766,883, og PCT publikasjon WO 97/24445. Andre kimære polypeptider kan inkludere et HSA-protein med FGF-21, eller fragmenter derav, festet til hver av de C-terminale og N-terminale endene av HSA-et. Slike HSA konstrukturer er vist i U.S. pat. nr. 5,876,969. Mammalsk celleekspresjon av FGF-21 er beskrevet i WO 2005/091944.

Ulike referanser viser modifikasjon av polypeptider ved polymerkonjugering eller glykosylering. Begrepet "FGF-21 polypeptid" inkluderer polypeptider konjugert til en polymer så som PEG og kan være omfattet av én eller flere ytterligere derivatiseringer av cystein, lysin eller andre rester. I tillegg kan FGF-21 polypeptidet omfatte en linker eller polymer, hvori aminosyren som linkeren eller polymeren er konjugert til kan være en ikke-naturlig aminosyre ifølge foreliggende oppfinnelse, eller kan være konjugert til en naturlig kodet aminosyre ved å utnytte teknikker kjent innen faget så som kopling til lysin eller cystein.

Polymer konjugering av FGF-21 og andre polypeptider har blitt rapportert. Se, *f.eks.* WO 2005/091944. U.S. pat. nr. 4,904,584 viser PEGylert lysin-utarmede polypeptider, hvori minst én lysinrest har blitt tatt bort eller erstattet med en hvilken som helst annen aminosyrerest. WO 99/67291 viser en prosess for å konjugere et protein med PEG, hvori minst én aminosyrerest på proteinet er tatt bort og proteinet blir brakt i kontakt med PEG under betingelser tilstrekkelig til å oppnå konjugering til proteinet. WO 99/03887 viser PEGylerte varianter av polypeptider som tilhører veksthormon-superfamilien, hvori en cysteinrest har blitt substituert med en ikke-essensiell aminosyrerest lokalisert i en spesifisert region av polypeptidet. WO 00/26354 viser en fremgangsmåte for fremstilling av en glykosylert polypeptidvariant med redusert allergenisitet, som sammenlignet med et tilsvarende opphavspolypeptid omfatter minst ett ytterligere glykosyleringssete. U.S. pat. nr. 5,218,092 viser modifikasjon av granulocyttkoloni stimulerende faktor (G-CSF) og andre polypeptider for å introdusere minst én ytterligere karbohydratkjede sammenlignet med det naturlige polypeptidet.

Begrepet "FGF-21 polypeptid" inkluderer også glykosylert FGF-21, så som men ikke begrenset til, polypeptider glykosylert ved en hvilken som helst aminosyreposisjon, N-tilknyttede eller O-tilknyttede glykosylerte former av polypeptidet. Varianter inneholdende enkelt-nukleotid-endringer er også vurdert som biologisk aktive varianter av FGF-21 polypeptid. I tillegg, er spleisevarianter også inkludert. Begrepet "FGF-21

polypeptid" inkluderer også FGF-21 polypeptid heterodimerer, homodimerer, heteromultimerer eller homomultimerer av hvilke som helst ene eller flere FGF-21 polypeptider eller hvilket som helst annet polypeptid, protein, karbohydrat, polymer, lite molekyl, linker, ligand eller annet biologisk aktivt molekyl av en hvilken som helst type, tilknyttet ved kjemiske metoder eller uttrykt som et fusjonsprotein, så vel som polypeptidanaloger inneholdende, for eksempel, spesifikke delesjoner eller andre modifikasjoner men som likevel opprettholder biologisk aktivitet.

Alle referanser til aminosyreposisjoner i FGF-21 beskrevet heri er basert på posisjonen i SEKV ID NR: 1, med mindre noe annet er spesifisert (dvs. når det er angitt at sammenligningen er basert på SEKV ID NR: 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller annen FGF-21 sekvens). For eksempel er aminosyren ved posisjon 77 ifølge SEKV ID NR: 1, et arginin og det tilsvarende argininet er lokalisert i SEKV ID NR: 2 ved posisjon 87. De med kunnskap innen faget vil erkjenne at aminosyreposisjoner tilsvarende posisjoner i SEKV ID NR: 1 lett kan bli identifisert i hvilket som helst annet FGF-21 molekyl så som SEKV ID NR: 2, 3, 4, 5, 6 og 7. De med kunnskap innen faget vil erkjenne at aminosyreposisjoner tilsvarende posisjoner i SEKV ID NR: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller en hvilken som helst annen FGF-21 sekvens lett kan bli identifisert i et hvilket som helst annet FGF-21 molekyl så som FGF-21 fusjoner, varianter, fragmenter, etc. For eksempel, kan sekvenssammenstillingsprogrammer så som BLAST bli brukt for å sammenstille og identifisere en spesiell posisjon i et protein som tilsvarer med en posisjon i SEKV ID NR: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller annen FGF-21 sekvens. Substitusjoner, delesjoner eller addisjoner av aminosyrer beskrevet heri i referanse til SEKV ID NR: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller annen FGF-21 sekvens er tenkt å også referere til substitusjoner, delesjoner eller addisjoner i tilsvarende posisjoner i FGF-21 fusjoner, varianter, fragmenter, etc. beskrevet heri eller kjent innen faget og er uttrykkelig omspent ved foreliggende oppfinnelse.

Begrepet "FGF-21 polypeptid" eller "FGF-21" omspenner FGF-21 polypeptider omfattende én eller flere aminosyresubstitusjoner, addisjoner eller delesjoner. FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter modifikasjoner med én flere naturlige aminosyrer i forbindelse med én ikke-naturlig aminosyremodifikasjon. Eksempelvis substitusjoner i en lang rekke aminosyreposisjoner i naturligforekommende FGF-21 polypeptider har blitt beskrevet, inkludert men ikke begrenset til substitusjoner som modulerer farmasøytisk stabilitet, som modulerer én eller flere av de biologiske aktivitetene av FGF-21 polypeptidet, så som men ikke begrenset til, øke agonistaktivitet, øke løselighet av polypeptidet, redusere proteaseømfintlighet, omforme polypeptidet til en antagonist, etc. og er omspent av begrepet "FGF-21 polypeptid." I noen utførelsesformer, omfatter FGF-21 antagonisten en ikke-naturlig kodet aminosyre knyttet til en vannløselig polymer som foreligger i en reseptorbindende region av FGF-21 molekylet.

I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidene videre en addisjon, substitusjon eller delesjon som modulerer biologisk aktivitet av FGF-21 polypeptidet. For eksempel, kan addisjonene, substitusjonene eller delesjonene modulere én eller flere egenskaper eller aktiviteter av FGF-21. For eksempel, kan addisjonene, substitusjonene eller delesjonene modulere affinitet for FGF-21 polypeptidreseptoren, 5 modulere sirkulerende halveringstid, modulere terapeutisk halveringstid, modulere stabilitet av polypeptidet, modulere spalting ved proteaser, modulere dose, modulere frigivelse eller bio-tilgjengelighet, legge til rette for rensing eller forbedre eller endre en spesiell administrasjonsrute. På lignende måte kan FGF-21 polypeptider omfatte 10 proteasespaltingssekvenser, reaktive grupper, antistoff-bindende domener (inkludert men ikke begrenset til, FLAG eller poly-His) eller andre affinitetsbaserte sekvenser (inkludert men ikke begrenset til, FLAG, poly-His, GST, etc.) eller tilknyttede molekyler (inkludert men ikke begrenset til, biotin) som forbedrer deteksjon (inkludert men ikke begrenset til, GFP), rensing eller andre karaktertrekk ved polypeptidet.

Begrepet "FGF-21 polypeptid" omspenner også homodimerer, heterodimerer, 15 homomultimerer og heteromultimerer som er tilknyttet, inkludert men ikke begrenset til de tilknyttet direkte via ikke-naturlig kodede aminosyresidekjeder, enten til de samme eller forskjellige ikke-naturlig kodede aminosyresidekjeder, til naturlig-kodede aminosyresidekjeder eller indirekte via en linker. Eksempelvis inkluderer men er 20 ikke begrenset til, små organiske forbindelser, vannløselige polymerer av et mangfold av lengder så som poly(etylenglykol) eller polydekstran eller polypeptider med ulike lengder.

En "ikke-naturlig kodet aminosyre" angir en aminosyre som ikke er én av de 20 25 vanlige aminosyrene eller pyrrolysin eller selenocystein. Andre begreper som kan bli brukt synonymt med begrepet "ikke-naturlig kodet aminosyre" er "ikke-naturlig aminosyre," "unaturlig aminosyre," "ikke-naturlig-forekommende aminosyre," og ulike orddelte og ikke-orddelte versjoner derav. Begrepet "ikke-naturlig kodet aminosyre" 30 inkluderer også, men er ikke begrenset til, aminosyrer som forekommer ved modifikasjon (f.eks. post-translasjonelle modifikasjoner) av en naturlig kodet aminosyre (inkludert men ikke begrenset til, de 20 vanlige aminosyrene eller pyrrolysin og selenocystein) men blir ikke selv naturlig inkorporert i en voksende polypeptidkjede ved translasjonskomplekset. 35 Eksempler på slike ikke-naturlig-forekommende aminosyrer inkluderer, men er ikke begrenset til, N-acetylglukosaminyll-L-serin, N-acetylglukosaminyll-L-treonin og O-fosfotyrosin.

En "aminoterminus modifikasjonsgruppe" angir et hvilket som helst molekyl som 35 kan være festet til aminoterminusen på et polypeptid. På lignende måte, angir en "karboksyterminus modifikasjonsgruppe" et hvilket som helst molekyl som kan være festet til karboksyterminusen på et polypeptid. Terminus-modifikasjonsgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, ulike vannløselige polymerer, peptider eller

proteiner så som serum albumin, eller andre andeler som øker serum-halveringstid av peptider.

Begrepene "funksjonell gruppe", "aktiv andel", "aktiverende gruppe", "forlatende gruppe", "reaktivt sete", "kjemisk reaktiv gruppe" og "kjemisk reaktiv andel" blir brukt  
5 innen faget og heri for å referere til distinkte, definerbare andeler eller enheter på et molekyl. Begrepene er ganske synonyme i de kjemiske fagene og blir brukt heri for å indikere andelene av molekyler som utfører en funksjon eller aktivitet og er reaktive med andre molekyler.

Begrepet "binding" eller "linker" er brukt heri for å referere til grupper eller  
10 bindinger som normalt blir dannet som resultatet av en kjemisk reaksjon og er typisk kovalente bindinger. Hydrolytisk stabile bindinger betyr at bindingene er hovedsakelig stabile i vann og ikke reagerer med vann ved nyttige pH-verdier, inkludert men ikke begrenset til, under fysiologiske betingelser i en forlenget tidsperiode, kanskje til og med i det uendelige. Hydrolytisk ustabile eller nedbrytbare bindinger betyr at bindingene er  
15 nedbrytbare i vann eller i vandige løsninger, inkludert for eksempel, blod. Enzymatisk ustabile eller nedbrytbare bindinger betyr at bindingen kan bli brutt ned ved ett eller flere enzymer. Som forstått innen faget, kan PEG og beslektede polymerer inkludere nedbrytbare bindinger i polymerryggraden eller i linkergruppen mellom polymerryggraden og én eller flere av de terminale funksjonelle gruppene av polymermolekylet. For eksempel  
20 vil esterbindinger dannet ved reaksjonen av PEG-karboksylysyrer eller aktiverte PEG-karboksylysyrer med alkoholgrupper på et biologisk aktivt middel generelt hydrolysere under fysiologiske betingelser for å friggi midlet. Andre hydrolytisk nedbrytbare bindinger inkluderer, men er ikke begrenset til, karbonatbindinger; iminbindinger resultert fra reaksjon av et amin og et aldehyd; fosfatesterbindinger dannet ved å reagere en alkohol  
25 med en fosfatgruppe; hydrazonbindinger som er reaksjonsprodukt av et hydrazid og et aldehyd; acetalbindinger som er reaksjonsproduktet av et aldehyd og en alkohol; ortoesterbindinger som er reaksjonsproduktet av et format og en alkohol; peptidbindinger dannet ved en amingruppe, inkludert men ikke begrenset til, ved en ende av en polymer så som PEG, og en karboksylgruppe av et peptid; og oligonukleotidbindinger dannet ved en  
30 fosforamidittgruppe, inkludert men ikke begrenset til, ved enden av en polymer, og en 5' hydroksylgruppe av et oligonukleotid.

Begrepet "biologisk aktivt molekyl", "biologisk aktiv andel" eller "biologisk aktivt middel" når brukt heri betyr en hvilken som helst substans som kan påvirke hvilke som  
35 helst fysiske eller biokjemiske egenskaper av et biologisk system, vei, molekyl eller vekselvirkning som relaterer seg til en organisme, inkludert men ikke begrenset til, virus, bakterier, bakteriofager, transposon, prion, insekter, fungi, planter, dyr og mennesker. Spesielt, som brukt heri, inkluderer biologisk aktive molekyler, men er ikke begrenset til, hvilken som helst substans tiltenkt for diagnose, helbredelse, lindring, behandling eller forhindring av sykdom i mennesker eller andre dyr, eller på annen måte forbedre fysisk

eller mentalt velvære for mennesker eller dyr. Eksempler på biologisk aktive molekyler inkluderer, men er ikke begrenset til, peptider, proteiner, enzymer, lite molekyl legemidler, vaksiner, immunogener, harde legemidler, myke legemidler, karbohydrater, uorganiske atomer eller molekyler, fargestoffer, lipider, nukleosider, radionuklider, oligonukleotider, toksoider, toksiner, prokaryotiske og eukaryotiske celler, virus, polysakkarider, nukleinsyrer og andeler derav oppnådd eller avledet fra virus, bakterier, insekter, dyr eller hvilken som helst annen celle eller celletype, liposomer, mikropartikler og miceller. Klasser av biologisk aktive midler som er egnet for bruk med oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til, legemidler, prodruger, radionuklider, avbildningsmidler, polymerer, antibiotika, fungicider, anti-virale midler, anti-inflammatoriske midler, anti-tumor midler, kardiovaskulære midler, anti-angstmidler, hormoner, vekstfaktorer, steroidale midler, mikrobielt avledelede toksiner og lignende.

En "bifunksjonell polymer" angir en polymer omfattende to diskrete funksjonelle grupper som er i stand til å reagere spesifikt med andre andeler (inkludert men ikke begrenset til, aminosyresidegrupper) for å danne kovalente eller ikke-kovalente bindinger. En bifunksjonell linker som har én funksjonell gruppe reaktiv med en gruppe på en spesiell biologisk aktiv komponent, og en annen gruppe reaktiv med en gruppe på en andre biologisk komponent, kan bli brukt for å danne et konjugat som inkluderer den første biologisk aktive komponenten, den bifunksjonelle linker og den andre biologisk aktive komponenten. Mange prosedyrer og linkermolekyler for tilknytning av ulike forbindelser til peptider er kjent. *Se, f.eks.* Europeisk patentpublikasjon nr. 188,256; U.S. patenter nr. 4,671,958, 4,659,839, 4,414,148, 4,699,784; 4,680,338; og 4,569,789. En "multi-funksjonell polymer" angir en polymer omfattende to eller flere diskrete funksjonelle grupper som er i stand til å reagere spesifikt med andre andeler (inkludert men ikke begrenset til, aminosyresidegrupper) for å danne kovalente eller ikke-kovalente bindinger. En bi-funksjonell polymer eller multi-funksjonell polymer kan være en hvilken som helst ønsket lengde eller molekylvekt, og kan bli valgt for å tilveiebringe en spesiell ønsket avstand eller konformasjon mellom ett eller flere molekyler knyttet til FGF-21 og dens reseptor eller FGF-21.

Der substituentgrupper er spesifisert ved deres konvensjonelle kjemiske formler, skrevet fra venstre mot høyre, innbefatter de likeledes de kjemisk identiske substituentene som ville resultere fra å skrive strukturen fra høyre mot venstre, for eksempel, er strukturen  $-\text{CH}_2\text{O}-$  ekvivalent med strukturen  $-\text{OCH}_2-$ .

Begrepet "substituent" inkluderer men er ikke begrenset til "ikke-inngripende substituent". "Ikke-inngripende substituent" er de gruppene som gir stabile forbindelser. Egnede ikke-inngripende substituent eller radikaler inkluderer, men er ikke begrenset til, halo,  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  alkyl,  $\text{C}_2\text{-C}_{10}$  alkenyl,  $\text{C}_2\text{-C}_{10}$  alkynyl,  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  alkoksy,  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  aralkyl,  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  alkaryl,  $\text{C}_3\text{-C}_{12}$  sykloalkyl,  $\text{C}_3\text{-C}_{12}$  sykloalkenyl, fenyl, substituert fenyl, toluoyl, xylenyl, bifenyl,  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  alkoksyalkyl,  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  alkoksyaryl,  $\text{C}_7\text{-C}_{12}$  aryloksyalkyl,

C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> oksyaryl, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkylsulfinyl, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylsulfonyl, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl) hvori m er fra 1 til 8, aryl, substituert aryl, substituert alkoksy, fluoralkyl, heterocyklisk radikal, substituert heterocyklisk radikal, nitroalkyl, -NO<sub>2</sub>, -CN, -NRC(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alkyl tioalkyl, -C(O)O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -OH, -SO<sub>2</sub>, =S, -COOH, -NR<sub>2</sub>, karbonyl, -C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)-CF<sub>3</sub>, -C(O)-CF<sub>3</sub>, -C(O)NR<sub>2</sub>, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> aryl)-S-(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> aryl), -C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> aryl), -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl) hvori hver m er fra 1 til 8, -C(O)NR<sub>2</sub>, -C(S)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, -NRC(O)NR<sub>2</sub>, -NRC(S)NR<sub>2</sub>, salter derav og lignende. Hver R som brukt heri er H, alkyl eller substituert alkyl, aryl eller substituert aryl, aralkyl eller alkaryl.

10 Begrepet "halogen" inkluderer fluor, klor, jod og brom.

Begrepet "alkyl," ved seg selv eller som del av en annen substituent, betyr, med mindre noe annet er angitt, en lineær eller forgrenet kjede, eller cyklisk hydrokarbonradikal, eller kombinasjon derav, som kan være fullstendig mettet, mono- eller polyumettet og kan inkludere di- og multivalente radikaler, som har det angitte antallet karbonatomer (dvs. C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> betyr ett til ti karboner). Eksempler på mettede hydrokarbonradikaler inkluderer, men er ikke begrenset til, grupper så som metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, t-butyl, isobutyl, sec-butyl, sykloheksyl, (sykloheksyl)metyl, syklopropylmetyl, homologer og isomerer av, for eksempel, n-pentyl, n-heksyl, n-heptyl, n-oktyl og lignende. En umettet alkylgruppe er én som har én eller flere dobbelbindinger eller trippelbindinger. Eksempler på umettede alkylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, vinyl, 2-propenyl, krotyl, 2-isopentenyl, 2-(butadienyl), 2,4-pentadienyl, 3-(1,4-pentadienyl), etynyl, 1- og 3-propynyl, 3-butynyl, og de høyere homologene og isomerene. Begrepet "alkyl," med mindre noe annet er anført, er også ment å inkludere de derivatene av alkyl definert mer detaljert under, så som "heteroalkyl." Alkylgrupper som er begrenset til hydrokarbongrupper er betegnet "homoalkyl".

Begrepet "alkylen" ved seg selv eller som del av en annen substituent betyr et divalent radikal avledet fra et alkan, som eksemplifisert, men ikke begrenset, ved strukturene -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- og -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, og inkluderer videre de gruppene beskrevet under som "heteroalkylen." Typisk vil en alkyl- (eller alkylen-) gruppe ha fra 1 til 24 karbonatomer, hvor de gruppene som har 10 eller færre karbonatomer er en spesiell utførelsesform av fremgangsmåtene og sammensetningene beskrevet heri. En "lavere alkyl" eller "lavere alkylen" er en kortere kjede alkyl- eller alkylengruppe, som generelt har åtte eller færre karbonatomer.

Begrepene "alkoksy," "alkylamino" og "alkyltio" (eller tioalkoksy) blir brukt i deres konvensjonelle betydning, og angir de alkylgruppene festet til resten av molekylet via henholdsvis et oksygenatom, en aminogruppe eller et svovelatom.

Begrepet "heteroalkyl," ved seg selv eller i kombinasjon med et annet begrep, betyr, med mindre noe annet er angitt, en stabil lineær eller forgrenet kjede, eller cyklisk hydrokarbonradikal, eller kombinasjoner derav, bestående av det angitte antall av



karbonatomer og minst ett heteroatom valgt fra gruppen bestående av O, N, Si og S, og hvori nitrogen- og svovelatomene eventuelt kan være oksidert og nitrogenheteroatomet eventuelt kan være kvaternisert. Heteroatomet(ene) O, N og S og Si kan være plassert ved en hvilken som helst indre posisjon i heteroalkylgruppen eller ved posisjonen hvor

5 alkylgruppen er festet til resten av molekylet. Eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{H}-\text{O}-\text{H}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$  og  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ . Opp til to heteroatomer kan være konsekutive, slik som, for eksempel,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  og  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . På lignende måte, betyr

10 begrepet "heteroalkylen" ved seg selv eller som del av en annen substituent en divalent radikal avledet fra heteroalkyl, som eksemplifisert, men ikke begrenset ved,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  og  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ . For heteroalkylengrupper, kan de samme eller forskjellige heteroatomer også oppta den ene eller begge av kjedeterminiene (inkludert men ikke begrenset til, alkylenoksy, alkylendioksy, alkylenamino, alkylendiamino,

15 aminooksyalkylen og lignende). Enda videre, for alkylen og heteroalkylen forbindende grupper, er det ikke forutsatt noen orientering av den sammenbindende gruppen ved retningen som formelen av den sammenbindende gruppen er skrevet i. For eksempel, representerer formelen  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  både  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  og  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ .

Begrepene "sykloalkyl" og "heterosykloalkyl", ved seg selv eller i kombinasjon

20 med andre begreper, representerer, med mindre noe annet er angitt, cycliske versjoner av henholdsvis "alkyl" og "heteroalkyl". Derfor inkluderer en sykloalkyl eller heterosykloalkyl mettede, delvis umettede og fullstendig umettede ringbindinger. I tillegg, for heterosykloalkyl, kan et heteroatom oppta posisjonen hvor heterocyklusen er festet til resten av molekylet. Eksempler på sykloalkyl inkluderer, men er ikke begrenset til,

25 syklopentyl, sykloheksyl, 1-sykloheksenyl, 3-sykloheksenyl, sykloheptyl og lignende. Eksempler på heterosykloalkyl inkluderer, men er ikke begrenset til, 1-(1,2,5,6-tetrahydropyridyl), 1-piperidinyl, 2-piperidinyl, 3-piperidinyl, 4-morfolinyl, 3-morfolinyl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydrofuran-3-yl, tetrahydrotien-2-yl, tetrahydrotien-3-yl, 1-piperazinyl, 2-piperazinyl og lignende. I tillegg, omfatter begrepet bicykliske og

30 tricykliske ringstrukturer. På lignende måte, betyr begrepet "heterosykloalkylen" ved seg selv eller som del av en annen substituent en divalent radikal avledet fra heterosykloalkyl, og begrepet "sykloalkylen" ved seg selv eller som del av en annen substituent betyr en divalent radikal avledet fra sykloalkyl.

Som brukt heri, angir begrepet "vannløselig polymer" en hvilken som helst

35 polymer som er løselig i vandige løsemidler. Binding av vannløselige polymerer til FGF-21 polypeptider kan resultere i forandringer inkludert, men ikke begrenset til, øket eller modulert serum-halveringstid, eller øket eller modulert terapeutisk halveringstid i forhold til den umodifiserte formen, modulert immunogenisitet, modulerte fysiske assosiasjonskarakteristikker så som aggregering og multimerdannelse, endret reseptorbinding, endret

binding til én eller flere bindingspartnere og endret reseptordimerisering eller multimerisering. Den vannløselige polymeren kan ha eller ikke ha sin egen biologiske aktivitet, og kan bli anvendt som en linker for å feste FGF-21 til andre substanser, inkludert men ikke begrenset til ett eller flere FGF-21 polypeptider, eller ett eller flere biologisk aktive molekyler. Egnede polymerer inkluderer, men er ikke begrenset til, polyetylenglykol, polyetylenglykol propionaldehyd, mono C1-C10 alkoksy- eller aryloksyderivater derav (beskrevet i U.S. patent nr. 5,252,714), monometoksy-polyetylenglykol, polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol, polyaminosyrer, divinyleter maleinsyreanhydrid, N-(2-hydroksypropyl)-metakrylamid, dekstran, dekstranderivater inkludert dekstransulfat, polypropylenglykol, polypropylenoksid/etylenoksid-kopolymer, polyoksyetylert polyol, heparin, heparinfragmenter, polysakkarider, oligosakkarider, glykaner, cellulose og cellulosederivater, inkludert men ikke begrenset til metylcellulose og karboksymetylcellulose, stivelse og stivelsederivater, polypeptider, polyalkylenglykol og derivater derav, kopolymerer av polyalkylenglykoler og derivater derav, polyvinyl-etyleter og alfa-beta-poly[(2-hydroksyetyl)-DL-aspartamid, og lignende, eller blandinger derav. Eksempler på slike vannløselige polymerer inkluderer, men er ikke begrenset til, polyetylenglykol og serumalbumin.

Som brukt heri, angir begrepet "polyalkylenglykol" eller "poly(alkenglykol)" polyetylenglykol (poly(etylenglykol)), polypropylenglykol, polybutylenglykol og derivater derav. Begrepet "polyalkylenglykol" omspinner både lineære og forgrenede polymerer og gjennomsnittlige molekylvekter på mellom 0,1 kDa og 100 kDa. Andre eksempelvis utførelsesformer er listet, for eksempel, i kommersielle leverandørkataloger, så som Shearwater Corporations katalog "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001).

Begrepet "aryl" betyr, med mindre noe annet er angitt, en polyumettet, aromatisk, hydrokarbonsubstituent som kan være en enkeltring eller mange ringer (inkludert men ikke begrenset til, fra 1 til 3 ringer) som er kondensert sammen eller knyttet sammen kovalent. Begrepet "heteroaryl" angir arylgrupper (eller ringer) som inneholder fra ett til fire heteroatomer valgt fra N, O og S, hvori nitrogen- og svovelatomene eventuelt er oksidert, og nitrogenatomet(ene) eventuelt er kvaternisert. En heteroarylgruppe kan være festet til resten av molekylet ved et heteroatom. Ikke-begrensede eksempler på aryl- og heteroarylgrupper inkluderer fenyl, 1-naftyl, 2-naftyl, 4-bifenyl, 1-pyrrolyl, 2-pyrrolyl, 3-pyrrolyl, 3-pyrazolyl, 2-imidazolyl, 4-imidazolyl, pyrazinyl, 2-oksazolyl, 4-oksazolyl, 2-fenyl-4-oksazolyl, 5-oksazolyl, 3-isoksazolyl, 4-isoksazolyl, 5-isoksazolyl, 2-tiazolyl, 4-tiazolyl, 5-tiazolyl, 2-furyl, 3-furyl, 2-tienyl, 3-tienyl, 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, 2-pyrimidyl, 4-pyrimidyl, 5-benzotiazolyl, purinyl, 2-benzimidazolyl, 5-indolyl, 1-isokinolyl, 5-isokinolyl, 2-kinoksalinyl, 5-kinoksalinyl, 3-kinolyl og 6-kinolyl. Substituenten for hver av aryl- og heteroarylringssystemene anført over er valgt fra gruppen av akseptable substituenten beskrevet under.

For kortfattethet inkluderer begrepet "aryl" når brukt i kombinasjon med andre begreper (inkludert men ikke begrenset til, aryloksy, aryltioksy, arylalkyl) både aryl- og heteroarylringer som definert over. Derfor er begrepet "arylalkyl" ment å inkludere de radikaler hvor en arylgruppe er festet til en alkylgruppe (inkludert men ikke begrenset til, 5 benzyl, fenetyl, pyridylmetyl og lignende) inkludert de alkylgruppene hvor et karbonatom (inkludert men ikke begrenset til, en metylengruppe) har blitt erstattet ved, for eksempel, et oksygenatom (inkludert men ikke begrenset til, fenoksymetyl, 2-pyridyloksymetyl, 3-(1-naftyloksi)propyl, og lignende).

Hvert av begrepene over (inkludert men ikke begrenset til, "alkyl," "heteroalkyl," 10 "aryl" og "heteroaryl") er ment å inkludere både substituerte og usubstituerte former av det indikerte radikalet. Eksempelvis substituenter for hver type radikal er tilveiebrakt under.

Substituentene for alkyl- og heteroalkylradikalene (inkludert de gruppene ofte referert til som alkyl, alkenyl, heteroalkyl, heteroalkenyl, alkynyl, sykloalkyl, 15 heterosykloalkyl, sykloalkenyl og heterosykloalkenyl) kan være én eller flere av et mangfold av grupper valgt fra, men ikke begrenset til: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halogen, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R"', -NR"C(O)<sub>2</sub>R', -NR-C(NR'R"R"')=NR"', -NR-C(NR'R"R"')=NR"', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R", -NRSO<sub>2</sub>R', -CN og -NO<sub>2</sub> i et antall 20 som spenner fra null til (2m'+1), hvor m' er det totale antall karbonatomer i et slik radikal. R', R", R"' og R"'' angir hver uavhengig hydrogen, substituert eller usubstituert heteroalkyl, substituert eller usubstituert aryl, inkludert men ikke begrenset til, aryl substituert med 1-3 halogener, substituert eller usubstituert alkyl, alkoksy eller tioalkoksygrupper, eller arylalkylgrupper. Når en forbindelse ifølge oppfinnelsen 25 inkluderer mer enn én R-gruppe, for eksempel, er hver av R-gruppene uavhengig valgt som hver er R', R", R"' og R"'' grupper når mer enn én av disse gruppene foreligger. Når R' og R" er tilknyttet det samme nitrogenatomet, kan de bli kombinert med nitrogenatomet for å danne en 5-, 6-, eller 7-leddet ring. For eksempel, er -NR'R" ment å inkludere, men ikke være begrenset til, 1-pyrrolidinyl og 4-morfolinyl. Fra diskusjonen 30 over av substituentene, vil en fagperson forstå at begrepet "alkyl" er ment å inkludere grupper inkludert karbonatomer bundet til grupper andre enn hydrogengrupper, så som haloalkyl (inkludert men ikke begrenset til, -CF<sub>3</sub> og -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) og acyl (inkludert men ikke begrenset til, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, og lignende).

Lignende substituentene beskrevet for alkylradikalet, er substituentene for aryl- og 35 heteroarylgruppene variert og er valgt fra, men er ikke begrenset til: halogen, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halogen, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR'R"', -NR"C(O)<sub>2</sub>R', -NR-C(NR'R"R"')=NR"', -NR-C(NR'R"R"')=NR"', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R", -NRSO<sub>2</sub>R', -CN og -NO<sub>2</sub>, -R', -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, fluor(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkoksy og fluor(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl, i et antall

som spenner fra null til det totale antall åpne valenser på det aromatiske ringsystemet; og hvor R', R'', R''' og R'''' er uavhengig valgt fra hydrogen, alkyl, heteroalkyl, aryl og heteroaryl. Når en forbindelse ifølge oppfinnelsen inkluderer mer enn én R-gruppe, for eksempel, er hver av R-gruppene uavhengig valgt som hver er R', R'', R''' og R'''' grupper  
5 når mer enn én av disse gruppene foreligger.

Som brukt heri, betyr begrepet "modulert serum-halveringstid" den positive eller negative forandring i sirkulerende halveringstid av en modifisert FGF-21 i forhold til dens ikke-modifiserte form. Serum-halveringstid blir målt ved å ta blodprøver ved ulike tidspunkter etter administrasjon av FGF-21, og bestemme konsentrasjonen av det  
10 molekylet i hver prøve. Korrelasjon av serumkonsentrasjonen med tid tillater beregning av serum-halveringstiden. Øket serum-halveringstid har ønskelig minst omkring to-ganger, men en mindre økning kan være nyttig, for eksempel hvor den muliggjør et tilfredsstillende doseringsregime eller unngår en toksisk effekt. I noen utførelsesformer er økningen minst omkring tre-ganger, minst omkring fem-ganger, eller minst omkring ti-  
15 ganger.

Begrepet "modulert terapeutisk halveringstid" som brukt heri betyr den positive eller negative forandring i halveringstiden av den terapeutisk effektive mengden av FGF-21, i forhold til dens ikke-modifiserte form. Terapeutisk halveringstid blir målt ved å måle farmakokinetiske og/eller farmakodynamiske egenskaper av molekylet ved ulike  
20 tidspunkter etter administrasjon. Øket terapeutisk halveringstid muliggjør ønskelig et spesielt fordelaktig doseringsregime, en spesielt fordelaktig totaldose eller unngår en uønsket effekt. I noen utførelsesformer, resulterer den økede terapeutiske halveringstid fra øket potens; øket eller redusert binding av det modifiserte molekylet til dets mål, øket eller redusert nedbrytning av molekylet ved enzymer så som proteaser, eller en økning  
25 eller reduksjon i en annen parameter eller virkningsmekanisme av det ikke-modifiserte molekylet eller en økning eller reduksjon i reseptor-mediert clearance av molekylet.

Begrepet "isolert," når anvendt til en nukleinsyre eller protein, betegner at nukleinsyren eller proteinet er uten minst noen av de cellulære komponenter som det er assosiert med i den naturlige tilstand, eller at nukleinsyren eller proteinet har blitt  
30 konsentrert til et nivå større enn konsentrasjonen av dets in vivo eller in vitro produksjon. Det kan være i en homogen tilstand. Isolerte substanser kan være i enten en tørr eller halv-tørr tilstand, eller i løsning, inkludert men ikke begrenset til, en vandig løsning. Det kan være en komponent av en farmasøytisk sammensetning som omfatter ytterligere farmasøytisk akseptable bærere og/eller eksipienser. Renhet og homogenitet blir typisk  
35 bestemt ved anvendelse av analytiske kjemiteknikker så som polyakrylamid-gelelektroforese eller høytytelse væskechromatografi. Et protein som er den dominerende typen som foreligger i et preparat er hovedsakelig rensset. Spesielt, blir et isolert gen separert fra åpne leserammer som flankerer genet og koder for et protein annet enn det interessante genet. Begrepet "renset" betegner at en nukleinsyre eller protein gir opphav

til hovedsakelig ett bånd i en elektroforetisk gel. Det kan spesielt bety at nukleinsyren eller proteinet er minst 85 % rent, minst 90 % rent, minst 95 % rent, minst 99 % eller mer rent.

Begrepet "nukleinsyre" angir deoksyribonukleotider, deoksyribonukleosider, 5 ribonukleosider eller ribonukleotider og polymerer derav i enten enkelt- eller dobbeltrådet form. Med mindre spesifikt begrenset, omspinner begrepet nukleinsyrer som inneholder kjente analoger av naturlige nukleotider som har lignende bindingsegenskaper som referansenukleinsyren og blir metabolisert på en måte lignende naturlig forekommende nukleotider. Med mindre spesifikt begrenset på annen måte, angir begrepet 10 også oligonukleotidanaloger inkludert PNA (peptidonukleinsyre), analoger av DNA brukt i antisense teknologi (fosfortioater, fosforamidater og lignende). Med mindre noe annet er indikert, omspinner en spesiell nukleinsyresekvens også implisitt konservativt modifiserte varianter derav (inkludert men ikke begrenset til, degenererte kodonsubstitusjoner) og komplementære sekvenser så vel som sekvensen eksplisitt indikert. Spesifikt kan 15 degenererte kodonsubstitusjoner bli oppnådd ved å generere sekvenser hvor den tredje posisjonen av ett eller flere valgte (eller alle) kodoner er substituert med blandet-base og/eller deoksyinosinrester (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Begrepene "polypeptid," "peptid" og "protein" blir brukt om hverandre heri for å 20 angi en polymer av aminosyrerester. Det vil si, en beskrivelse rettet mot et polypeptid gjelder likeledes en beskrivelse av et peptid og en beskrivelse av et protein, og vice versa. Begrepene gjelder naturlig forekommende aminosyrepolymerer så vel som aminosyrepolymerer hvor én eller flere aminosyrerester er en ikke-naturlig kodet aminosyre. Som 25 brukt heri, innbefatter begrepene aminosyrekjeder av en hvilken som helst lengde, inkludert full lengde proteiner, hvori aminosyrerestene er knyttet sammen ved kovalente peptidbindinger.

Begrepet "aminosyre" angir naturlig forekommende og ikke-naturlig forekommende aminosyrer, så vel som aminosyreanaloger og aminosyremimetika som 30 fungerer på en måte lignende de naturlig forekommende aminosyrene. Naturlig kodede aminosyrer er de 20 vanlige aminosyrene (alanin, arginin, asparagin, asparginsyre, cystein, glutamin, glutaminsyre, glysin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, fenyilalanin, prolin, serin, treonin, tryptofan, tyrosin og valin) og pyrrolysin og selenocystein. Aminosyreanaloger angir forbindelser som har den samme grunnleggende 35 kjemiske struktur som en naturlig forekommende aminosyre, dvs. et karbon som er bundet til et hydrogen, en karboksylgruppe, en aminogruppe og en R-gruppe, slik som, homoserin, norleucin, metioninsulfoksid, metionin metylsulfonium. Slike analoger har modifiserte R-grupper (slik som, norleucin) eller modifiserte peptidryggrader, men beholder den samme grunnleggende kjemiske strukturen som en naturlig forekommende

aminosyre. Referanse til en aminosyre inkluderer, for eksempel, naturlig forekommende proteogene L-aminosyrer; D-aminosyrer, kjemisk modifiserte aminosyrer så som aminosyrevarianter og derivater; naturlig forekommende ikke-proteogene aminosyrer så som  $\beta$ -alanin, ornitin, etc.; og kjemisk syntetiserte forbindelser som har egenskaper kjent innen faget for å være karakteristiske for aminosyrer. Eksempler på ikke-naturlig forekommende aminosyrer inkluderer, men er ikke begrenset til,  $\alpha$ -metyl aminosyrer (f.eks.  $\alpha$ -metylalanin), D-aminosyrer, histidin-lignende aminosyrer (f.eks. 2-amino-histidin,  $\beta$ -hydrokxy-histidin, homohistidin,  $\alpha$ -fluormetyl-histidin og  $\alpha$ -metylhistidin), aminosyrer som har en ekstra metylen i sidekjeden ("homo" aminosyrer) og aminosyrer hvor en karboksylsyre funksjonell gruppe i sidekjeden er erstattet med en sulfonsyre-gruppe (f.eks. cysteinsyre).

Aminosyrer kan bli referert til heri ved enten deres vanligvis kjente tre-bokstav symboler eller ved én-bokstav symbolene anbefalt ved IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Nukleotider, kan likeledes bli referert til ved deres vanligvis aksepterte enkelt-bokstav koder.

"Konservativt modifiserte varianter" gjelder både aminosyre- og nukleinsyre-sekvenser. Med hensyn til spesielle nukleinsyresekvenser, refererer "konservativt modifiserte varianter" til de nukleinsyrene som koder for identiske eller til vesentlig identiske aminosyresekvenser, eller hvor nukleinsyren ikke koder for en aminosyre-sekvens, vesentlig identiske sekvenser. På grunn av degenerasjonen av den genetiske koden, koder et stort antall funksjonelt identiske nukleinsyrer for et hvilket som helst gitt protein. For eksempel, koder kodonene GCA, GCC, GCG og GCU alle for aminosyren alanin. Derfor, ved hver posisjon hvor en alanin er spesifisert ved et kodon, kan kodonet bli endret til et hvilket som helst av de tilsvarende kodonene beskrevet, uten å endre det kodede polypeptidet. Slike nukleinsyrevariasjoner er "tause variasjoner," som er én type konservativt modifiserte variasjoner. Hver nukleinsyresekvens heri som koder for et polypeptid beskriver også hver mulige tause variasjon av nukleinsyren. En fagperson vil erkjenne at hvert kodon i en nukleinsyre (unntatt AUG, som ordinært er det eneste kodonet for metionin, og TGG, som ordinært er det eneste kodonet for tryptofan) kan bli modifisert for å gi et funksjonelt identisk molekyl. Følgelig er hver tause variasjon av en nukleinsyre som koder for et polypeptid implisitt i hver beskrevne sekvens.

Når det gjelder aminosyresekvenser, vil en fagperson erkjenne at individuelle substitusjoner, delesjoner eller addisjoner til en nukleinsyre, peptid, polypeptid eller proteinsekvens som endrer, legger til eller fjerner en enkelt aminosyre eller en liten prosentandel av aminosyrer i den kodede sekvensen er en "konservativt modifisert variant" hvor endringen resulterer i delesjonen av en aminosyre, addisjon av en aminosyre, eller substitusjon av en aminosyre med en kjemisk lignende aminosyre. Konservative substitusjonstabeller som tilveiebringer funksjonelt lignende aminosyrer er

kjent for fagpersonene. Slike konservativt modifiserte varianter er i tillegg til og utelukker ikke polymorfe varianter, homologer mellom artene og alleler ifølge oppfinnelsen.

Konservative substitusjonstabeller som tilveiebringer funksjonelt lignende aminosyrer er kjent for fagpersonene. De følgende åtte gruppene inneholder alle aminosyrer som er konservative substitusjoner for hverandre:

- 1) Alanin (A), Glysin (G);
- 2) Asparbinsyre (D), Glutaminsyre (E);
- 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);
- 4) Arginin (R), Lysin (K);
- 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Metionin (M), Valin (V);
- 6) Fenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptofan (W);
- 7) Serin (S), Treonin (T); og
- 8) Cystein (C), Metionin (M)

(se, f.eks. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2. utgave (desember 1993)

Begrepene "identisk" eller prosent "identitet," i konteksten av to eller flere nukleinsyrer eller polypeptidsekvenser, angir to eller flere sekvenser eller undersekvenser som er de samme. Sekvenser er "hovedsakelig identiske" hvis de har en prosentandel av aminosyrerester eller nukleotider som er de samme (dvs. omkring 60 % identitet, omkring 65 %, omkring 70 %, omkring 75 %, omkring 80 %, omkring 85 %, omkring 90 % eller omkring 95 % identitet over en spesifisert region), når sammenlignet og sammenstilt for maksimalt samsvar over et sammenligningsvindu, eller designert region som målt ved anvendelse av én av de følgende sekvenssammenligningsalgoritmene (eller andre algoritmer tilgjengelig for fagpersoner) eller ved manuell sammenstilling og visuell inspeksjon. Denne definisjonen angir også komplementet av en testsekvens. Identiteten kan eksistere over en region som er minst omkring 50 aminosyrer eller nukleotider i lengde, eller over en region som er 75-100 aminosyrer eller nukleotider i lengde, eller, hvor ikke spesifisert, over hele sekvensen av et polynukleotid eller polypeptid. Et polynukleotid som koder for et polypeptid ifølge foreliggende oppfinnelse, inkludert homologer fra arter andre enn menneske, kan bli oppnådd ved en prosess omfattende trinnene med screening av et bibliotek under strenge hybridiseringsbetingelser med en merket probe som har en polynukleotidsekvens ifølge oppfinnelsen eller et fragment derav, og isolere full-lengde cDNA og genomiske kloner inneholdende nevnte polynukleotidsekvens. Slike hybridiseringsteknikker er velkjent for den erfarne fagpersonen.

For sekvenssammenligning, virker typisk én sekvens som en referansesekvens, som testsekvensene blir sammenlignet med. Når en anvender en sekvenssammenligningsalgoritme, blir test- og referansesekvenser tastet inn i en datamaskin, undersekvenskoordinater blir designert, hvis nødvendig, og sekvensalgoritmeprogramparametere blir

designert. Forhåndsgitte programparametere kan bli brukt, eller alternative parametere kan bli designert. Sekvenssammenligningsalgoritmen beregner så prosenten sekvensidentiteter for testsekvensene i forhold til referansesekvensen, basert på programparametere.

5 Et "sammenligningsvindu", som brukt heri, inkluderer referanse til et segment av en hvilken som helst av antallet tilstøtende posisjoner valgt fra gruppen bestående av fra 20 til 600, vanligvis omkring 50 til omkring 200, vanligere omkring 100 til omkring 150 hvor en sekvens kan bli sammenlignet med en referansesekvens av det samme antall tilstøtende posisjoner etter at de to sekvensene er optimalt sammenstilt. Fremgangsmåter  
10 for sammenstilling av sekvenser for sammenligning er kjent for fagpersonene. Optimal sammenstilling av sekvenser for sammenligning kan bli utført, inkludert men ikke begrenset til, ved lokal homologialgoritmen ifølge Smith og Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, ved homologisammenstillingsalgoritmen ifølge Needleman og Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, ved søk for likhet metoden ifølge Pearson og Lipman (1988)  
15 Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, ved databehandlede implementeringer av disse algoritmene (GAP, BESTFIT, FASTA og TFASTA i Wisconsin Genetics programvarepakken, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), eller ved manuell sammenstilling og visuell inspeksjon (*se, f.eks.* Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 tillegg)).

20 Ett eksempel på en algoritme som er egnet for å bestemme prosent sekvensidentitet og sekvenslikhet er BLAST og BLAST 2.0 algoritmene, som er beskrevet i henholdsvis Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, og Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Programvare for å utføre BLAST analyser er offentlig tilgjengelig ved the National Center for Biotechnology Information tilgjengelig på verdensveven på  
25 ncbi.nlm.nih.gov. BLAST algoritmeparameterne W, T og X bestemmer sensitiviteten og hastigheten av sammenstillingen. BLASTN programmet (for nukleotidsekvenser) bruker som forhåndsgitt en ordlengde (W) på 11, en forventning (E) på 10, M=5, N=-4 og en sammenligning av begge trådene. For aminosyresekvenser bruker BLASTP programmet som forhåndsgitt en ordlengde på 3, og forventning (E) på 10, og BLOSUM62 scoringsmatrise (*se* Henikoff og Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915)  
30 sammenstillinger (B) på 50, forventning (E) på 10, M=5, N=-4, og en sammenligning av begge tråder. BLAST algoritmen blir typisk utført med "lav kompleksitet" filteret skrudd av.

BLAST algoritmen utfører også en statistisk analyse av likheten mellom to  
35 sekvenser (*se, f.eks.* Karlin og Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Ett mål for likhet tilveiebrakt ved BLAST algoritmen er den minste sum-sannsynligheten (P(N)), som tilveiebringer en indikasjon på sannsynligheten som et samsvar mellom to nukleotid- eller aminosyresekvenser ville forekomme tilfeldig ved. For eksempel blir en nukleinsyre vurdert lignende til en referansesekvens hvis minste sum sannsynligheten i en



sammenligning av testnukleinsyren til referansenukleinsyren er mindre enn omkring 0,2, eller mindre enn omkring 0,01, eller mindre enn omkring 0,001.

Frasen "selektivt (eller spesifikt) hybridiserer til" angir bindingen, dupleksering, eller hybridiseringen av et molekyl bare til en spesiell nukleotidsekvens under strenge hybridiseringsbetingelser når den sekvensen foreligger i en kompleks blanding (inkludert men ikke begrenset til, totalt cellulært eller bibliotek DNA eller RNA).

Frasen "strenge hybridiseringsbetingelser" angir hybridisering av sekvenser av DNA, RNA, PNA, eller andre nukleinsyremimetika, eller kombinasjoner derav under betingelser med lav ionestyrke og høy temperatur som det er kjent innen faget. Under strenge betingelser vil en probe typisk hybridisere til dens målundersekvens i en kompleks blanding av nukleinsyre (inkludert men ikke begrenset til, totalt cellulært eller bibliotek DNA eller RNA) men hybridiserer ikke til andre sekvenser i den komplekse blandingen. Strenge betingelser er sekvens-avhengige og vil være forskjellige under forskjellige omstendigheter. Lengre sekvenser hybridiserer spesifikt ved høyere temperaturer. En omfattende veiledning til hybridiseringen av nukleinsyrer blir funnet i Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generelt er strenge betingelser valgt til å være omkring 5-10 °C lavere enn det termiske smeltepunktet ( $T_m$ ) for den spesifikke sekvensen ved en definert ionestyrke pH.  $T_m$ -en er den temperaturen (under definert ionestyrke, pH, og nukleinkonsentrasjon) hvor 50 % av probene komplementære til målet hybridiserer til målsekvensen ved likevekt (ettersom målsekvensene foreligger i overskudd, er ved  $T_m$ , 50 % av probene opptatt ved likevekt). Strenge betingelser kan være de hvor saltkonsentrasjonen er mindre enn omkring 1,0 M natriumion, typisk omkring 0,01 til 1,0 M natriumionkonsentrasjon (eller andre salter) ved pH 7,0 til 8,3 og temperaturen er minst omkring 30 °C for korte prober (inkludert men ikke begrenset til, 10 til 50 nukleotider) og minst omkring 60 °C for lange prober (inkludert men ikke begrenset til, større enn 50 nukleotider). Strenge betingelser kan også bli oppnådd med tilsetningen av destabiliserende midler så som formamid. For selektiv eller spesifikk hybridisering, kan et positivt signal være minst to ganger bakgrunns-, eventuelt 10 ganger bakgrunnshybridisering. Eksempelvis strenge hybridiseringsbetingelser kan være som følger: 50 % formamid, 5X SSC, og 1 % SDS, inkubering ved 42 °C, eller 5X SSC 1 % SDS, inkubering ved 65 °C, med vask i 0,2X SSC, og 0,1 % SDS ved 65 °C. Slike vasker kan bli utført i 5, 15, 30, 60, 120, eller flere minutter.

Som brukt heri, angir begrepet "eukaryot" organismer som tilhører det fylogenetiske domene Eucarya så som dyr (inkludert men ikke begrenset til, pattedyr, insekter, reptiler, fugler, etc.), ciliater, planter (inkludert men ikke begrenset til, monokoter, dikoter, alger, etc.), fungi, gjær, flagellater, mikrosporidier, protister, etc.

Som brukt heri, angir begrepet "ikke-eukaryot" ikke-eukaryotiske organismer. For eksempel, kan en ikke-eukaryotisk organisme tilhøre til det eubakterie (inkludert men ikke begrenset til, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, etc.)

5 fylogenetiske domenet, eller det archaea (inkludert men ikke begrenset til, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* så som *Haloferax volcanii* og *Halobacterium* typer *NRC-1*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix*, etc.) fylogenetiske domenet.

10 Begrepet "subjekt" som brukt heri, angir et dyr, i noen utførelsesformer av redegjørelsen et pattedyr, og i andre utførelsesformer et menneske, som er gjenstand for behandling, observasjon eller eksperiment. Et dyr kan være et selskapsdyr (f.eks. hunder, katter og lignende), gårdsdyr (f.eks. kyr, sauer, griser, hester og lignende) eller et laboratoriedyr (f.eks. rotter, mus, marsvin og lignende).

15 Begrepet "effektiv mengde" som brukt heri angir den mengden av det modifiserte ikke-naturlig aminosyre polypeptidet som blir administrert som i noe grad vil lindre ett eller flere av symptomene på sykdommen, tilstanden eller forstyrrelsen som blir behandlet. Sammensetninger inneholdende det modifiserte ikke-naturlig aminosyre polypeptidet beskrevet heri kan bli administrert for profylaktiske, forsterkende og/eller  
20 terapeutiske behandlinger.

Begrepene "forsterke" eller "forsterkende" betyr å øke eller forlenge enten i potens eller varighet en ønsket effekt. Derfor, med hensyn til å forsterke virkningen av terapeutiske midler, angir begrepet "forsterkende" evnen til å øke eller forlenge, enten i potens eller varighet, virkningen av andre terapeutiske midler på et system. En  
25 "forsterkende-effektiv mengde," som brukt heri, angir en mengde tilstrekkelig til å forsterke virkningen av et annet terapeutisk middel i et ønsket system. Når brukt i en pasient, vil mengder effektive for denne anvendelsen avhenge av alvorlighetsgraden og forløpet av sykdommen, forstyrrelsen eller tilstanden, tidligere terapi, pasientens helsestatus og respons til legemidlene, og vurderingen til den behandlende legen.

30 Begrepet "modifisert," som brukt heri angir hvilke som helst forandringer gjort til et gitt polypeptid, så som forandringer til lengden av polypeptidet, aminosyresekvensen, kjemisk struktur, ko-translasjonell modifikasjon eller post-translasjonell modifikasjon av et polypeptid. Formen "(modifisert)" begrep betyr at polypeptidene som blir diskutert eventuelt er modifisert, det vil si, polypeptidene under diskusjon kan være modifisert eller  
35 umodifisert.

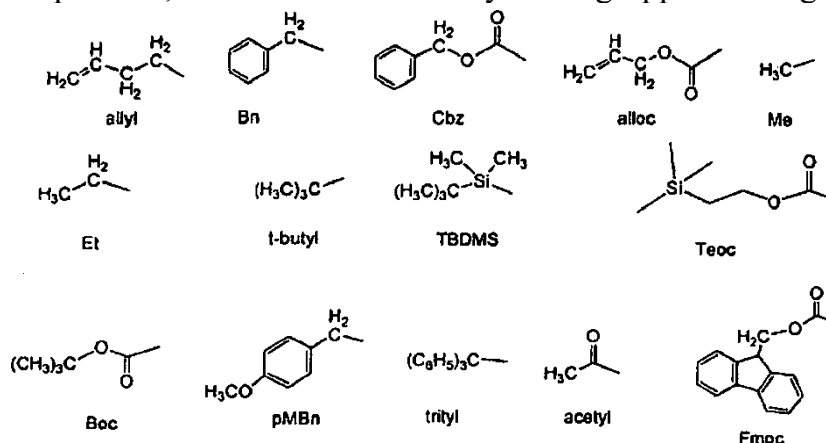
Begrepet "post-translasjonelt modifisert" angir en hvilken som helst modifikasjon av en naturlig eller ikke-naturlig aminosyre som forekommer til en slik aminosyre etter at den har blitt inkorporert i en polypeptidkjede. Begrepet omspenner, ved eksempel bare, ko-translasjonelle in vivo modifikasjoner, ko-translasjonelle in vitro modifikasjoner (slik

som i et celle-fritt translasjonssystem), post-translasjonelle *in vivo* modifikasjoner og post-translasjonelle *in vitro* modifikasjoner.

I profylaktiske anvendelser, blir sammensetninger inneholdende FGF-21 polypeptidet administrert til en pasient som er disponert for eller på annen måte har risiko for en spesiell sykdom, forstyrrelse eller tilstand. En slik mengde er definert til å være en "profylaktisk effektiv mengde." I denne anvendelsen, avhenger de nøyaktige mengdene også av pasientens tilstand av helse, vekt og lignende. Det er vurdert godt innen fagkunnskapen for en å bestemme slike profylaktisk effektive mengder ved rutine-eksperimentering (f.eks. et doseeskalerings klinisk forsøk).

Begrepet "beskyttet" angir nærværet av en "beskyttende gruppe" eller andel som forhindrer reaksjon av den kjemisk reaktive funksjonelle gruppen under visse reaksjonsbetingelser. Den beskyttende gruppen vil variere avhengig av typen kjemisk reaktiv gruppe som blir beskyttet. For eksempel, hvis den kjemisk reaktive gruppen er et amin eller et hydrazid, kan den beskyttende gruppen kan være valgt fra gruppen av tert-butylloksykarbonyl (t-Boc) og 9-fluorenylmetoksykarbonyl (Fmoc). Hvis den kjemisk reaktive gruppen er en tiol, kan den beskyttende gruppen være ortopyridyldisulfid. Hvis den kjemisk reaktive gruppen er en karboksylsyre, så som butan- eller propionsyre, eller en hydroksylgruppe, kan den beskyttende gruppen være benzyl eller en alkylgruppe så som metyl, etyl eller tert-butyl. Andre beskyttende grupper kjent innen faget kan også bli brukt i eller med fremgangsmåtene og sammensetningene beskrevet heri, inkludert fotolabile grupper så som Nvoc og MeNvoc. Andre beskyttende grupper kjent innen faget kan også bli brukt i eller med fremgangsmåtene og sammensetningene beskrevet heri.

Ved eksempel bare, kan blokkerende/beskyttende grupper bli valgt fra:



Andre beskyttende grupper er beskrevet i Greene og Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3. utg., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999.

I terapeutiske anvendelser, blir sammensetninger inneholdende det modifiserte ikke-naturlig aminosyre polypeptidet administrert til en pasient som allerede lider av en sykdom, tilstand eller forstyrrelse, i en mengde tilstrekkelig til å helbrede eller minst delvis stoppe symptomene på sykdommen, forstyrrelsen eller tilstanden. En slik mengde er definert til å være en "terapeutisk effektiv mengde," og vil avhenge av alvorlighets-

graden og forløpet av sykdommen, forstyrrelsen eller tilstanden, tidligere terapi, pasientens helsestatus og respons til legemidlene, og vurderingen til den behandlende lege. Det blir vurdert godt innen fagkunnskapen for en å bestemme slike terapeutisk effektive mengder ved rutineeksperimentering (f.eks. et doseeskalerings klinisk forsøk).

5 Begrepet "behandling" blir brukt for å angi enten profylaktiske og/eller terapeutiske behandlinger.

Ikke-naturlig kodet aminosyre polypeptider presentert heri kan inkludere isotopisk-merkede forbindelser med ett eller flere atomer erstattet ved et atom som har en atommasse eller massetall forskjellig fra atommassen eller massetallet vanligvis funnet i naturen. Eksempler på isotoper som kan være inkorporert i de foreliggende forbindelser inkluderer isotoper av hydrogen, karbon, nitrogen, oksygen, fluor og klor, så som henholdsvis  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ . Visse isotopisk-merkede forbindelser beskrevet heri, for eksempel de som radioaktive isotoper så som  $^3\text{H}$  og  $^{14}\text{C}$  er inkorporert i, kan være nyttige i legemiddel- og/eller substrat-vevsfordelingsanalyser. Videre kan substitusjon med isotoper så som deuterium, dvs.  $^2\text{H}$ , gi visse terapeutiske fordeler som resulterer fra større metabolsk stabilitet, for eksempel øket in vivo halveringstid eller reduserte doseringskrav.

Alle isomerer inkludert men ikke begrenset til diastereomerer, enantiomerer og blandinger derav blir vurdert som del av sammensetningene beskrevet heri. I ytterligere eller videre utførelsesformer, blir de ikke-naturlig kodede aminosyrepolypeptidene metabolisert etter administrasjon til en organisme med behov for å produsere en metabolitt som så blir brukt for å produsere en ønsket effekt, inkludert en ønsket terapeutisk effekt. I videre eller ytterligere utførelsesformer er aktive metabolitter av ikke-naturlig kodede aminosyrepolypeptider.

25 I noen situasjoner, kan ikke-naturlig kodede aminosyrepolypeptider eksistere som tautomerer. I tillegg, kan de ikke-naturlig kodede aminosyrepolypeptidene beskrevet heri eksistere i usolvatiserte så vel som solvatiserte former med farmasøytisk akseptable løsemidler så som vann, etanol og lignende. De solvatiserte formene blir også vurdert til å være vist heri. Fagpersonene vil erkjenne at noen av forbindelsene heri kan eksistere i flere tautomere former. Alle slik tautomere former blir vurdert som del av sammensetningene beskrevet heri.

Med mindre noe annet er indikert, blir det anvendt konvensjonelle metoder innen fagkunnskapen for massespektroskopi, NMR, HPLC, proteinkjemi, biokjemi, rekombinante DNA teknikker og farmakologi.

## 35 DETALJERT BESKRIVELSE

### *I. Introduksjon*

FGF-21 molekyler omfattende én unaturlig aminosyre er tilveiebrakt i oppfinnelsen. I visse utførelsesformer av oppfinnelsen, inkluderer FGF-21 polypeptidet med én unaturlig aminosyre minst én post-translasjonell modifikasjon omfattende tilknytning av et molekyl av en vann-løselig polymer. I én utførelsesform av redegjørelsen, omfatter

5 den minst éne post-translasjonelle modifikasjonen tilknytning av et molekyl inkludert men ikke begrenset til; et merke, et fargestoff, en polymer, en vann-løselig polymer, et derivat av polyetylenglykol, en fotokryssbinder, et radionuklid, en cytotoxisk forbindelse, et legemiddel, et affinitetsmerke, et fotoaffinitetsmerke, en reaktiv forbindelse, en harpiks, et andre protein eller polypeptid eller polypeptidanalogue, et

10 antistoff eller antistofffragment, en metalkompleksdanner, en kofaktor, en fettsyre, et karbohydrat, et polynukleotid, et DNA, et RNA, et antisense polynukleotid, et sakkarid, en vann-løselig dendrimer, en syklodekstrin, en inhiberende ribonukleinsyre, et biomateriale, en nanopartikkel, et spinnmerke, en fluorofor, en metall-holdig andel, en radioaktiv andel, en hittil ukjent funksjonell gruppe, en gruppe som kovalent eller ikke-

15 kovalent vekselvirker med andre molekyler, en fotoaktiverbar andel, en aktinisk strålingseksiterbar andel, en fotoisomeriserbar andel, biotin, et derivat av biotin, en biotin analog, en andel som inkorporerer et tungt atom, en kjemisk spaltbar gruppe, en fotospaltbar gruppe, en forlenget sidekjede, et karbon-tilknyttet sukker, et redoks-aktivt middel, en amino-tiosyre, en toksisk andel, en isotopisk merket andel, en biofysisk probe,

20 en fosforescent gruppe, en kjemiluminescent gruppe, en elektrontett gruppe, en magnetisk gruppe, en innskytende gruppe, en kromofor, et energioverføringsmiddel, et biologisk aktivt middel, et detekterbart merke, et lite molekyl, et kvantepunkt, en nanotransmitter, et radionukleotid, en radiotransmitter, et nøytron-fange middel, eller en hvilken som helst kombinasjon av de over eller en hvilken som helst annen ønskelig forbindelse eller

25 substans, omfattende en andre reaktive gruppe til minst én unaturlig aminosyre omfattende en første reaktive gruppe ved utnyttelse av kjemimetodologi som er kjent for en fagperson for å være egnet for de spesielle reaktive gruppene. For eksempel, er den første reaktive gruppen en alkynylandel (inkludert men ikke begrenset til, i den unaturlige aminosyren *p*-propargyloksyfenylalanin, hvor propargylgruppen noen ganger også blir referert til som en acetylenandel) og den andre reaktive gruppen er en azidoandel, og

30 [3+2] sykloaddisjonskjemimetodologier blir utnyttet. I et annet eksempel, er den første reaktive gruppen azidoandelen (inkludert men ikke begrenset til, i den unaturlige aminosyren *p*-azido-L-fenylalanin) og den andre reaktive gruppen er alkynylandelen. I visse utførelsesformer av det modifiserte FGF-21 polypeptidet ifølge foreliggende

35 oppfinnelse, blir det brukt minst én unaturlig aminosyre (inkludert men ikke begrenset til, unaturlig aminosyre inneholdende en ketofunksjonell gruppe) omfattende minst én post-translasjonell modifikasjon, hvor den minst éne post-translasjonelle modifikasjonen omfatter en sakkarid-andel. I visse utførelsesformer, blir den post-translasjonelle modifikasjonen gjort *in vivo* i en eukaryotisk celle eller i en ikke-eukaryotisk celle. En

linker, polymer, vannløselig polymer eller annet molekyl kan feste molekylet til polypeptidet. Molekylet kan være knyttet direkte til polypeptidet.

I visse utførelsesformer, inkluderer proteinet minst én post-translasjonell modifikasjon som blir gjort *in vivo* ved én vertscelle, hvor den post-translasjonelle modifikasjonen normalt blir gjort ved en annen vertscelletepe. I visse utførelsesformer, inkluderer proteinet minst én post-translasjonell modifikasjon som blir gjort *in vivo* ved en eukaryotisk celle, hvor den post-translasjonelle modifikasjonen normalt blir gjort ved en ikke-eukaryotisk celle. Eksempler på post-translasjonelle modifikasjoner inkluderer, men er ikke begrenset til, glykosylering, acetylering, acylering, lipid-modifikasjon, palmitoylering, palmitataddisjon, fosforylering, glykolipid-bindingsmodifikasjon og lignende. I én utførelsesform, omfatter den post-translasjonelle modifikasjonen tilknytning av et oligosakkarid til en asparagin ved en GlcNAc-asparagin-binding (inkludert men ikke begrenset til, hvor oligosakkaridet omfatter (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc og lignende). I en annen utførelsesform, omfatter den post-translasjonelle modifikasjonen tilknytning av et oligosakkarid (inkludert men ikke begrenset til, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) til et serin eller treonin ved en GalNAc-serin-, en GalNAc-treonin-, en GlcNAc-serin- eller en GlcNAc-treonin-binding. I visse utførelsesformer kan et protein eller polypeptid ifølge oppfinnelsen omfatte en sekresjons- eller lokaliseringsssekvens, en epitoptag, en FLAG-tag, en polyhistidin-tag, en GST-fusjon, og/eller lignende. Eksempler på sekresjonssignalsekvenser inkluderer, men er ikke begrenset til, en prokaryotisk sekresjonssignalsekvens, en eukaryotisk sekresjonssignalsekvens, en eukaryotisk sekresjonssignalsekvens 5'-optimalisert for bakteriell ekspresjon, en ny sekresjonssignalsekvens, pektat-lyase sekresjonssignalsekvens, Omp A sekresjonssignalsekvens og en fag-sekresjonssignalsekvens. Eksempler på sekresjonssignalsekvenser, inkluderer, men er ikke begrenset til, STII (prokaryotisk), Fd GIII og M13 (fag), Bgl2 (gjær), og signalsekvensen bla avledet fra et transposon. En hvilken som helst slik sekvens kan bli modifisert til å tilveiebringe et ønsket resultat med polypeptidet, inkludert men ikke begrenset til, substituering av én signalsekvens med en forskjellig signalsekvens, substituering av en ledersekvens med en forskjellig ledersekvens, etc.

Det interessante proteinet eller polypeptidet inneholder én unaturlig aminosyre. Én av en spesiell aminosyre som foreligger i en naturlig forekommende versjon av proteinet er substituert med en unaturlig aminosyre.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter og sammensetninger basert på FGF-21 omfattende én ikke-naturlig kodet aminosyre. Introduksjon av én ikke-naturlig kodet aminosyre i FGF-21 kan sørge for anvendelsen av konjugeringskjemier som involverer spesifikke kjemiske reaksjoner, inkludert, men ikke begrenset til, med én ikke-naturlig kodet aminosyrer mens den ikke reagerer med de vanlig forekommende 20 aminosyrene. I noen utførelsesformer er FGF-21 omfattende den ikke-naturlig kodede aminosyren knyttet til en vannløselig polymer, så som polyetylenglykol (PEG), via

sidekjeden av den ikke-naturlig kodede aminosyren. Denne oppfinnelsen tilveiebringer en svært effektiv fremgangsmåte for den selektive modifikasjonen av proteiner med PEG-derivater, som involverer den selektive inkorporeringen av ikke-genetisk kodede aminosyrer, inkludert men ikke begrenset til, de aminosyrene som inneholder funksjonelle grupper eller substituenten ikke funnet i de 20 naturlig inkorporerte aminosyrene, inkludert men ikke begrenset til et keton, en azid- eller acetylenandel, i proteiner som svar på et selektorkodon og den påfølgende modifikasjon av de aminosyrene med et passende reaktivt PEG-derivat. Med én gang de er inkorporert, kan aminosyresidekjedene så bli modifisert ved å utnytte kjemimetodologier kjent for fagpersonene som å være egnet for de spesielle funksjonelle gruppene eller substituentene som foreligger i den ikke-naturlig kodede aminosyren. Kjente kjemimetodologier av et vidt mangfold er egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse for å inkorporere en vannløselig polymer i proteinet. Slike metodologier inkluderer men er ikke begrenset til en Huisgen [3+2] sykloaddisjonsreaksjon (*se, f.eks.* Padwa, A. i *Comprehensive Organic Synthesis*, bind. 4, (1991) utg. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, s. 1069-1109; og Huisgen, R. i *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) utg. Padwa, A., Wiley, New York, s. 1-176) med, inkludert men ikke begrenset til, henholdsvis acetylen- eller azidderivater.

Fordi Huisgen [3+2] sykloaddisjonsmetoden involverer en sykloaddisjon snarere enn en nukleofil substitusjonsreaksjon, kan proteiner bli modifisert med ekstremt høy selektivitet. Reaksjonen kan bli utført ved romtemperatur i vandige betingelser med utmerket regioselektivitet (1,4 > 1,5) ved tilsetningen av katalytiske mengder Cu(I)-salter til reaksjonsblandingen. *Se, f.eks.* Tornøe, et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; og, Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; og WO 03/101972. Et molekyl som kan bli tillagt til et protein ifølge oppfinnelsen ved en [3+2] sykloaddisjon inkluderer praktisk talt et hvilket som helst molekyl med en egnet funksjonell gruppe eller substituent inkludert men ikke begrenset til et azido- eller acetylderivat. Disse molekylene kan bli lagt til en unaturlig aminosyre med en acetylengruppe, inkludert men ikke begrenset til, p-propargyloksyfenylalanin eller azidogruppe, inkludert men ikke begrenset til p-azido-fenylalanin, respektivt.

Den fem-leddede ringen som resulterer fra Huisgen [3+2] sykloaddisjonen er ikke generelt reversibel i reduserende miljøer og er stabil overfor hydrolyse i forlengede perioder i vandige miljøer. Følgelig kan de fysiske og kjemiske karakteristikkene av en lang rekke substanser bli modifisert under krevende vandige betingelser med de aktive PEG-derivatene ifølge foreliggende oppfinnelse. Enda viktigere, fordi azid- og acetylenandelene er spesifikke for hverandre (og ikke, for eksempel, reagerer med en hvilken som helst av de 20 vanlige, genetisk-kodede aminosyrene), kan proteiner bli modifisert i ett eller flere spesifikke seter med ekstremt høy selektivitet.

Oppfinnelsen tilveiebringer også vannløselige og hydrolytisk stabile derivater av PEG-derivater og beslektede hydrofile polymerer som har én eller flere acetylen- eller

azid-andeler. PEG-polymerderivatene som inneholder acetylenandeler er svært selektive for kopling med azid-andeler som har blitt introdusert selektivt i proteiner som svar på et selektorkodon. På lignende måte er PEG-polymerderivater som inneholder azid-andeler svært selektive for kopling med acetylenandeler som har blitt introdusert selektivt i

5 proteiner som svar på et selektorkodon.

Mer spesifikt omfatter azid-andelene, men er ikke begrenset til, alkylazider, arylazider og derivater av disse azidene. Derivatene av alkyl- og arylazidene kan inkludere andre substituentter så lenge den acetylen-spesifikke reaktiviteten blir opprettholdt. Acetylenandelene omfatter alkyl- og arylacetylenere og derivater av hver.

10 Derivatene av alkyl- og arylacetylenene kan inkludere andre substituentter så lenge den azid-spesifikke reaktiviteten blir opprettholdt.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer konjugater av substanser som har en lang rekke funksjonelle grupper, substituentter eller andeler, med andre substanser inkludert en vann-løselig polymer. Også vist er konjugater med, men ikke begrenset til et merke; et

15 fargestoff; en polymer; et derivat av polyetylen glykol; en fotokryssbinder; et radionuklid; en cytotoxisk forbindelse; et legemiddel; et affinitetsmerke; et fotoaffinitetsmerke; en reaktiv forbindelse; en harpiks; et andre protein eller polypeptid eller polypeptid analog; et antistoff eller antistofffragment; en metall-kompleksdanner; en kofaktor; en fettsyre; et karbohydrat; et polynukleotid; et DNA; et RNA; et antisense polynukleotid; et sakkarid;

20 en vann-løselig dendrimer; et syklodekstrin; en inhiberende ribonukleinsyre; et biomateriale; en nanopartikkel; et spinmerke; en fluorofor, en metall-holdige andel; en radioaktiv andel; en ny funksjonell gruppe; en gruppe som kovalent eller ikke-kovalent vekselvirker med andre molekyler; en fotoaktiverbar andel; en aktinisk strålingseksiterbar andel; en fotoisomeriserbar andel; biotin; et derivat av biotin; en biotin analog; en andel

25 som inkorporerer et tungt atom; en kjemisk spaltbar gruppe; en fotospaltbar gruppe; en forlenget sidekjede; et karbon-tilknyttet sukker; et redoks-aktivt middel; en amino-tiosyre; en toksisk andel; en isotopisk merket andel; en biofysisk probe; en fosforescent gruppe; en kjemiluminescent gruppe; en elektrontett gruppe; en magnetisk gruppe; en innskytende gruppe; en kromofor; et energioverføringsmiddel; et biologisk aktivt middel; et

30 detekterbart merke; et lite molekyl; et kvantepunkt; en nanotransmitter; et radionukleotid; en radiotransmitter; et nøytron-fange middel; eller en hvilken som helst kombinasjon av de over, eller en hvilken som helst annen ønskelig forbindelse eller substans. Foreliggende oppfinnelse inkluderer også konjugater av substanser som har azid- eller acetylenandeler med PEG-polymerderivater som har de tilsvarende acetylen- eller azid-andelene.

35 For eksempel, kan en PEG-polymer inneholdende en azid-andel bli koplet til et biologisk aktivt molekyl ved en posisjon i proteinet som inneholder en ikke-genetisk kodet aminosyre som bærer en acetylenfunksjonalitet. Bindingen som PEG-en og det biologisk aktive molekylet blir koplet ved inkluderer men er ikke begrenset til Huisgen [3+2] sykloaddisjonsproduktet.



Det er veletablert innen faget at PEG kan bli brukt for å modifisere overflatene av biomaterialer (se, f.eks. U.S. patent 6,610,281; Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci., 3(1):125-136 (2000)). Redegjørelsen inkluderer også biomaterialer omfattende en overflate som har ett eller flere reaktive azid- eller acetylen seter og én eller flere av de azid- eller acetylen-holdige polymerene ifølge oppfinnelsen koplet til overflaten via Huisgen [3+2] sykloaddisjonsbindingen. Biomaterialer og andre substanser kan også bli koplet til de azid- eller acetylen-aktiverte polymerderivatene ved en binding annen enn azid- eller acetylenbindingen, så som ved en binding omfattende en karboksylsyre-, amin-, alkohol- eller tiolandel, for å etterlate azid- eller acetylenandelen tilgjengelig for påfølgende reaksjoner.

Redegjørelsen inkluderer en fremgangsmåte for å syntetisere de azid- og acetylen-holdige polymerene ifølge oppfinnelsen. I tilfellet med det azid-holdige PEG-derivatet, kan azidet være bundet direkte til et karbonatom på polymeren. Alternativt, kan det azid-holdige PEG-derivatet bli fremstilt ved å feste et sammenbindende middel som har azid-andelen ved én terminus til en konvensjonell aktivert polymer slik at den resulterende polymeren har azid-andelen ved sin terminus. I tilfellet med det acetylen-holdige PEG-derivatet, kan acetylenen være bundet direkte til et karbonatom på polymeren. Alternativt, kan det acetylen-holdige PEG-derivatet bli fremstilt ved å feste et sammenbindende middel som har acetylenandelen ved én terminus til en konvensjonell aktivert polymer slik at den resulterende polymeren har acetylenandelen ved sin terminus.

Mer spesifikt, i tilfellet med det azid-holdige PEG-derivatet undergår en vannløselig polymer som har minst en aktiv hydroksyl-andel, en reaksjon for å danne en substituert polymer som har en mer reaktiv andel, så som en mesylat, tresylat, tosylat eller halogen forlatende gruppe, derpå. Fremstillingen og anvendelsen av PEG-derivater inneholdende sulfonylsyrehalogenider, halogenatomer og andre forlatende grupper er kjent for fagpersonene. Den resulterende substituerte polymeren undergår så en reaksjon for å substituere for den mer reaktive andelen en azid-andel ved terminusen av polymeren. Alternativt undergår en vannløselig polymer som har minst én aktiv nukleofil eller elektrofil andel, en reaksjon med et sammenbindende middel som har et azid ved én terminus slik at en kovalent binding blir dannet mellom PEG-polymeren og det sammenbindende midlet og azid-andelen blir posisjonert ved terminusen av polymeren. Nukleofile og elektrofile andeler, inkludert aminer, tioler, hydrazider, hydraziner, alkoholer, karboksylater, aldehyder, ketoner, tioestere og lignende, er kjent for fagpersonene.

Mer spesifikt, i tilfellet med det acetylen-holdige PEG-derivatet, undergår en vannløselig polymer som har minst en aktiv hydroksyl-andel, en reaksjon for å forskyve et halogen eller annen aktivert forlatende gruppe fra et forstadium som inneholder en acetylenandel. Alternativt, undergår en vannløselig polymer som har minst én aktiv nukleofil eller elektrofil andel en reaksjon med et sammenbindende middel som har en

acetylen ved én terminus slik at en kovalent binding blir dannet mellom PEG-polymeren og det sammenbindende midlet og acetylenandelen blir posisjonert ved terminusen av polymeren. Anvendelsen av halogenandeler, aktivert forlatende gruppe, nukleofile og elektrofile andeler i konteksten med organisk syntese og fremstillingen og anvendelsen av PEG-derivater er veletablert for utøverne innen faget.

Redegjørelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for den selektive modifikasjonen av proteiner for å tilføre andre substanser til det modifiserte proteinet, inkludert men ikke begrenset til vannløselige polymerer så som PEG og PEG-derivatene inneholdende en azid- eller acetylenandel. De azid- og acetylen-holdige PEG-derivatene kan bli brukt for å modifisere egenskapene av overflater og molekyler hvor biokompatibilitet, stabilitet, løselighet og mangel på immunogenisitet er viktig, mens en på samme tid tilveiebringer en mer selektiv måte for å tilknytte PEG-derivatene til proteiner enn det som tidligere var kjent innen faget.

## *II. Fibroblastvekstfaktorer*

På grunn av deres potente aktiviteter for å fremme vekst, proliferasjon, overlevelse og differensiering av en lang rekke celler og vevstyper, fortsetter FGfer å bli videreført som terapeutiske midler for en rekke forskjellige indikasjoner, inkludert sårhelbredelse, så som muskel-skjelett-tilstander, for eksempel, benbrudd, ligament- og vevsreparasjon, tendionitt, bursitt, etc.; hudtilstander, for eksempel, forbrenninger, kutt, laserasjoner, liggesår, sent helbredende ulcere, etc.; vevsbeskyttelse, reparasjon og induksjonen av angiogenese i løpet av myokardial infarkt og iskemi, i behandlingen av nevrologiske tilstander, for eksempel, nevrodegenerativ sykdom og slag, i behandlingen av øyesykdom, inkludert makulær degenerasjon og lignende.

Fibroblastvekstfaktor (FGF) proteinene identifisert hittil tilhører en familie av signalmolekyler som regulerer vekst og differensiering av et mangfold av celletyper. Signifikansen av FGF-proteiner overfor human fysiologi og patologi relater seg delvis til deres nøkkelroller i embryogenese, i blodkarutvikling og vekst, og i benvekst. In vitro eksperimenter har bevist en rolle for FGF i regulering av cellevekst og deling av endoteliale celler, vaskulære glatte muskelceller, fibroblaster og kardiale og skjelettmyocytter. Andre medlemmer av FGF-familien og deres biologiske roller er beskrevet i Crossley et al., *Development* 121:439-451 (1995); Ohuchi et al., *Development* 124:2235-2244 (1997); Gemel et al., *Genomics* 35:253-257 (1996); og Ghosh et al., *Cell Growth and Differentiation* 7:1425-1434 (1996).

FGF-proteiner er også signifikante for human helse og sykdom på grunn av en rolle i kreftcellevekst. For eksempel ble FGF-8 identifisert som en androgen-indusert vekstfaktor i bryst- og prostata kreftceller. (Tanaka et al., *FEBS Lett.* 363:226-230 (1995) og *P.N.A.S.* 89:8928-8932 (1992)).

Rollen til FGF i normal utvikling blir belyst delvis ved studier av FGF-reseptorer. Wilke, T. et al., *Dev. Dynam.* 210:41-52 (1997) fant at FGFR1, FGFR2 og FGFR3 transkripter ble lokalisert til spesifikke regioner av hodet i løpet av embryonisk utvikling i kyllinger. Ekspresjonsmønsteret korrelerte med områder påvirket av humane FGFR mutasjoner i Crouzon syndrom, en tilstand med abnormal intramembran bendannelse. Belluardo, N. et al., *Jour. Comp. Neur.* 379:226-246 (1997) studerte lokalisering av FGFR 1, 2, og 3 mRNAer i rottehjerne, og fant cellulær spesifisitet i mange hjerneregioner. Dessuten ble FGFR1 og FGFR2 mRNAer uttrykt i astrogliale reaktive celler etter hjernelesjon, noe som støtter en rolle av visse FGFRer i hjernesykdom og -skade. Ozawa, K. et al., *Mol. Brain Res.* 41:279-288 (1996) rapporterte at FGF1 og FGF-5 ekspresjon øket etter fødsel, mens FGF3, FGF-6, FGF-7 og FGF-8 gener viste høyere ekspresjon i sene embryoniske stadier enn i postnatale stadier. En kofaktor, Klotho beta (Klb), kan også være involvert med signaltransduksjon av FGF-21 og dens reseptor. Klb har blitt rapportert å øke evnen FGFR1 og FGFR4 har til å binde FGF21. Klb er et enkelt-

passering transmembranprotein og selv om rollen av den fullstendige transmembran-

formen er ukjent, har det blitt vist med hensyn til FGF23 at Klotho forsterket FGF23-

binding og øket fosforylering av FGF-reseptor mens Klotho beta har blitt vist å forsterke FGF-21 binding (H. Kurosu, Y. Ogawa, M. Miyoshi, M. Yamamoto, A. Nandi, K. P. Rosenblatt, M. G. Baum, S. Schiavi, M.-C. Hu, O. W. Moe, M. Kuro-o, Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *J. Biol. Chem.* 281, 6120-6123 (2006)).

Katoh et al. (*International Journal of Oncology* (2006) 29:163-168) beskriver FGF-familien og fylogenetiske analyser av familiemedlemmene. Katoh et al. diskuterer også signalveinettverk i den gastrointestinale kanalen.

Plotnikov et al. (*Cell* (1999) 98:641-650) beskriver krystallstrukturen av FGF2 med FGF-reseptor 1 (FGFR1) og den 2-ganger symmetriske dimeren som blir dannet mellom to av disse kompleksene. Plotnikov et al. tilveiebringer en modell for dimerisering av reseptoren og induksjon av dimerisering ved FGF og heparin.

Ytterligere medlemmer av FGF-familien er sannsynlig å bli oppdaget i fremtiden. Nye medlemmer av FGF-familien kan bli identifisert gjennom datamaskin-støttede sekundære og tertiære strukturanalyser av de forutsagte proteinsekvensene, og ved seleksjonsteknikker designet for å identifisere molekyler som binder til et spesielt mål.

Derfor er beskrivelsen av FGF-familien tilveiebrakt bare for illustrerende formål og ved eksempel og ikke som en grense for omfanget av fremgangsmåtene, sammensetningene, strategiene og teknikkene beskrevet heri. Videre er referanse til FGF-21 i denne anvendelsen tenkt å bruke det generiske begrepet som et eksempel på et hvilket som helst medlem av FGF-familien. Det blir derfor forstått at modifikasjonene og kjemiene beskrevet heri med referanse til FGF-21 polypeptider eller protein likeledes kan bli anvendt for et hvilket som helst medlem av FGF-familien, inkludert de spesifikt listet heri.

### III. Generelle rekombinante nukleinsyremetoder for bruk med oppfinnelsen

I tallrike utførelsesformer av foreliggende redegjørelse, vil nukleinsyrer som koder for et interessant FGF-21 polypeptid bli isolert, klonet og ofte endret ved anvendelse av rekombinante metoder. Slike utførelsesformer av redegjørelsen blir brukt, inkludert men ikke begrenset til, for proteinekspressjon eller i løpet av genereringen av varianter, derivater, ekspresjonskassetter eller andre sekvenser avledet fra et FGF-21 polypeptid. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, er sekvensene som koder for polypeptidene ifølge oppfinnelsen funksjonsdyktig knyttet til en heterolog promoter.

En nukleotidsekvens som koder for et FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre kan bli syntetisert på grunnlaget av aminosyresekvensen av opphavspolypeptidet, inkludert men ikke begrenset til, å ha aminosyresekvensen vist i SEKV ID NR: 1-7 og deretter forandre nukleotidsekvensen for å bevirke introduksjon (dvs. inkorporering eller substitusjon) eller fjerning (dvs. delesjon eller substitusjon) av de(n) relevante aminosyreresten(e). Nukleotidsekvensen kan bli beleilig modifisert ved seterettet mutagenese i samsvar med konvensjonelle metoder. Alternativt, kan nukleotidsekvensen bli fremstilt ved kjemisk syntese, inkludert men ikke begrenset til, ved anvendelse av en oligonukleotid synthesizer, hvori oligonukleotider blir designet basert på aminosyresekvensen av det ønskede polypeptidet, og fortrinnsvis velge de kodoner som er favorisert i vertscellen som det rekombinante polypeptidet vil bli produsert i. For eksempel, kan mange små oligonukleotider som koder for andeler av det ønskede polypeptidet bli syntetisert og satt sammen ved PCR, ligasjon eller ligasjon kjedereaksjon. *Se, f.eks.* Barany, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189-193 (1991); U.S. patent 6,521,427.

Denne oppfinnelsen utnytter rutineteknikker innen feltet rekombinant genetikk. Grunnleggende tekster som viser de generelle fremgangsmåter for bruk i denne oppfinnelsen inkluderer Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3. utg. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); og Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., red., 1994).

Generelle tekster som beskriver molekylærbiologiske teknikker inkluderer Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology bind 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2. utg.), bind 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook") og Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., red., Current Protocols, et fellesforetagende mellom Greene Publishing Associates, Inc. og John Wiley & Sons, Inc., (komplettert i løpet av 1999) ("Ausubel"). Disse tekstene beskriver mutagenese, anvendelsen av vektorer, promotere og mange andre relevante temaer beslektet til, inkludert men ikke begrenset til, genereringen av gener eller

polynukleotider som inkluderer selektorkodoner for produksjon av proteiner som inkluderer unaturlige aminosyrer, ortogonale tRNAer, ortogonale syntetaser, og par deriv.

Ulike typer mutagenese blir brukt i oppfinnelsen for et mangfold av formål, inkludert men ikke begrenset til, for å tilvirke nye syntetaser eller tRNAer, for å mutere  
5 tRNA-molekyler, for å mutere polynukleotider som koder for syntetaser, for å tilvirke biblioteker av tRNAer, for å tilvirke biblioteker av syntetaser, for å tilvirke selektor-kodoner, for å sette inn selektorkodoner som koder for unaturlige aminosyrer i et interessant protein eller polypeptid. De inkluderer men er ikke begrenset til sete-rettet, tilfeldig punkt mutagenese, homolog rekombinering, DNA-shuffling eller andre rekursive  
10 mutagenesemetoder, kimær konstruksjon, mutagenese ved anvendelse av uracil-holdige templatler, oligonukleotid-rettet mutagenese, fosfortioat-modifisert DNA mutagenese, mutagenese ved anvendelse av "gapped dupleks" DNA eller lignende, PCT-mediert mutagenese eller en hvilken som helst kombinasjon deriv. Ytterligere egnede metoder inkluderer punkt-feilparingsreparasjon, mutagenese ved anvendelse av reparasjon-  
15 manglede vertsstammer, restriksjon-seleksjon og restriksjon-rensing, delesjon-mutagenese, mutagenese ved total gensyntese, dobbel-tråd bruddreparasjon og lignende. Mutagenese, inkludert men ikke begrenset til, involvering av kimære konstrukter, er også inkludert i foreliggende oppfinnelse. I én utførelsesform, kan mutagenese bli styrt ved kjent informasjon om det naturlig forekommende molekylet eller endret eller mutert  
20 naturlig forekommende molekyl, inkludert men ikke begrenset til, sekvens, sekvens-sammenligninger, fysiske egenskaper, sekundær, tertiær eller kvaternær struktur, krystallstruktur eller lignende.

Tekstene og eksemplene funnet heri beskriver disse prosedyrene. Ytterligere informasjon blir funnet i de følgende publikasjoner og referanser anført i dem: Ling et al.,  
25 Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science* 229:1193-1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. og Lilley, D.M.J. red., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.*  
30 154, 367-382 (1987); Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned

into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers et al., 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers et al., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer et al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*, *Cell* 38:879-887 (1984); Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells et al., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuklease S protein, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakmar and Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells et al., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, *Gene* 34:315-323 (1985); Grundström et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber, et al., *Nature Biotechnology*,

19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); og I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995). Ytterligere detaljer om mange av metodene over kan bli funnet i *Methods in Enzymology* bind 154, som også beskriver nyttige kontroller for problemløsning av problemer med ulike mutagenesemetoder.

5 Oligonukleotider, f.eks. for bruk i mutagenese ifølge foreliggende oppfinnelse, f.eks. mutere biblioteker av syntetaser, eller endre tRNAer, blir typisk syntetisert kjemisk ifølge fast-fase fosforamiditt-triester-metoden beskrevet ved Beaucage og Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862, (1981) f.eks. ved anvendelse av en automatisert synthesizer, som beskrevet i Needham-VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:6159-  
10 6168 (1984).

Redegjørelsen omhandler også eukaryotiske vertsceller, ikke-eukaryotiske vertsceller, og organismer for in vivo inkorporeringen av en unaturlig aminosyre via ortogonale tRNA/RS par. Vertsceller blir genetisk konstruert (inkludert men ikke begrenset til, transformert, transdusert eller transfektert) med polynukleotidene ifølge  
15 redegjørelsen eller konstrukt som inkluderer et polynukleotid ifølge redegjørelsen, inkludert men ikke begrenset til, en vektor ifølge redegjørelsen, som kan være, for eksempel, en kloningsvektor eller en ekspresjonsvektor. For eksempel, er de kodende regionene for den ortogonale tRNA, den ortogonale tRNA syntetase og proteinet som skal bli derivatisert, funksjonsdyktig knyttet til genekspresjonskontrollelementer som er  
20 funksjonelle i den ønskede vertscellen. Vektoren kan være, for eksempel, i form av et plasmid, et kosmid, en fag, en bakterie, et virus, et nakent polynukleotid eller et konjugert polynukleotid. Vektorene blir introdusert inn i celler og/eller mikroorganismer ved standard fremgangsmåter inkludert elektroporering (Fromm et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5824 (1985)), infeksjon ved virale vektorer, høy hastighet ballistisk penetrering  
25 ved små partikler med nukleinsyren enten innen matrisen av små kuler eller partikler, eller på overflaten (Klein et al., *Nature* 327, 70-73 (1987)), og/eller lignende.

De konstruerte vertscellene kan bli kultivert i konvensjonelle næringsmiddelmedier modifisert som passende for slike aktiviteter som, for eksempel, screeningtrinn, aktivere promotere eller selektare transformanter. Disse cellene kan eventuelt bli kultivert inn i  
30 transgene organismer. Andre nyttige referanser, inkludert men ikke begrenset til for celleisolering og kultur (f.eks. for påfølgende nukleinsyreisolering) inkluderer Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, tredje utgave, Wiley-Liss, New York og referansene anført deri; Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg og Phillips (red.)  
35 (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) og Atlas og Parks (red.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Mange vel-kjente metoder for å introdusere målnukleinsyrer inn i celler er tilgjengelige, en hvilken som helst av disse kan bli brukt i redegjørelsen. Disse inkluderer:

fusjon av resipientcellene med bakterielle protoplaster inneholdende DNA, elektroporering, prosjektilbombardment og infeksjon med virale vektorer (diskutert videre, under), etc. Bakterielle celler kan bli brukt for å forsterke antallet plasmider som inneholder DNA-konstrukter ifølge denne redegjørelsen. Bakteriene blir dyrket for å logge fase og plasmidene innen bakteriene kan bli isolert ved et mangfold av fremgangsmåter kjent innen faget (*se*, for eksempel, Sambrook). I tillegg, er kits kommersielt tilgjengelig for rensingen av plasmider fra bakterier, (*se*, f.eks. EasyPrep™, FlexiPrep™, begge fra Pharmacia Biotech; StrataClean™ fra Stratagene; og, QIAprep™ fra Qiagen). De isolerte og rensede plasmidene blir deretter videre manipulert for å tilvirke andre plasmider, brukt for å transfektere celler eller inkorporert inn i beslektede vektorer for å infisere organismer. Typiske vektorer inneholder transkripsjons- og translasjons-terminatorer, transkripsjons- og translasjons-initieringssekvenser, og promotere som er nyttige for regulering av ekspresjonen av den spesielle målnukleinsyren. Vektorene omfatter eventuelt generiske ekspresjonskassetter inneholdende minst én uavhengig terminatorsekvens, sekvenser som tillater replikering av kassetten i eukaryoter, eller prokaryoter, eller begge, (inkludert men ikke begrenset til, shuttlevektorer) og seleksjonsmarkører for både prokaryotiske og eukaryotiske systemer. Vektorer er egnet for replikering og integrering i prokaryoter, eukaryoter, eller begge. *Se*, Gillam & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, et al., Nature 328:731 (1987); Schneider, E., et al., Protein Expr. Purif. 6(1):10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (*alle supra*). En katalog av bakterier og bakteriofager nyttige for kloning er tilveiebrakt, f.eks. ved ATCC, f.eks. The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al. (red) publisert ved ATCC. Ytterligere grunnleggende prosedyrer for sekvensering, kloning og andre aspekter ved molekylærbiologi og underliggende teoretiske betraktninger er også funnet i Watson et al. (1992) Recombinant DNA andre utgave Scientific American Books, NY. I tillegg kan egentlig en hvilken som helst nukleinsyre (og praktisk talt en hvilken som helst merket nukleinsyre, enten standard eller ikke-standard) bli laget på bestilling eller standard bestilt fra hvilken som helst av et mangfold av kommersielle kilder, så som the Midland Certified Reagent Company (Midland, TX tilgjengelig på verdensveven på [mrc.com](http://mrc.com)), The Great American Gene Company (Ramona, CA tilgjengelig på verdensveven på [genco.com](http://genco.com)), ExpressGen Inc. (Chicago, IL tilgjengelig på verdensveven på [expressgen.com](http://expressgen.com)), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) og mange andre.

### SELEKTORKODONER

Selektorkodoner ifølge oppfinnelsen utvider det genetiske kodon-rammeverket av protein biosyntetisk maskineri. For eksempel, inkluderer et selektorkodon, men er ikke begrenset til, et unikt tre-base-kodon, et nonsense-kodon, så som et stoppkodon, inkludert men ikke begrenset til, et amberkodon (UAG), et ochrekodon eller et opalkodon (UGA), et unaturlig kodon, et fire- eller flere base-kodon, et sjeldent kodon, eller lignende. Det er



lett åpenbart for fagpersonene at det er et vidt område i antallet selektorkodoner som kan bli introdusert inn i et ønsket gen eller polynukleotid, inkludert men ikke begrenset til, ett eller flere, to eller flere, tre eller flere, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 eller flere i et enkelt polynukleotid som koder for minst en del av FGF-21 polypeptidet.

5 I én utførelsesform, involverer fremgangsmåtene ifølge redegjørelsen anvendelsen av et selektorkodon som er et stoppkodon for inkorporeringen av én eller flere unaturlige aminosyrer in vivo. For eksempel, blir det produsert et O-tRNA som gjenkjenner stoppkodonet, inkludert men ikke begrenset til, UAG, og blir aminoacylert ved en O-RS med en ønsket unaturlig aminosyre. Dette O-tRNA blir ikke gjenkjent ved den naturlig  
10 forekommende vertens aminoacyl-tRNA syntetaser. Konvensjonell seterettet mutagenese kan bli brukt for å introdusere stoppkodonet, inkludert men ikke begrenset til, TAG, ved det interessante setet i et interessant polypeptid. *Se, f.eks.* Sayers, J.R., et al. (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, 16:791-802. Når O-RS, O-tRNA og nukleinsyren som koder for det  
15 interessante polypeptidet blir kombinert in vivo, blir den unaturlige aminosyren inkorporert som svar på UAG kodonet for å gi et polypeptid inneholdende den unaturlige aminosyren ved den spesifiserte posisjonen.

Inkorporeringen av unaturlige aminosyrer in vivo kan bli gjort uten signifikant forstyrrelse av den eukaryotiske vertscellen. For eksempel, fordi supresjonseffektiviteten  
20 for UAG kodonet avhenger av konkurransen mellom O-tRNA<sub>et</sub>, inkludert men ikke begrenset til, ambersuppressor tRNA<sub>et</sub>, og en eukaryotisk frigivelsesfaktor (inkludert men ikke begrenset til, eRF) (som binder til et stoppkodon og initierer frigivelse av det voksende peptidet fra ribosomet), kan supresjonseffektiviteten bli modulert ved, inkludert men ikke begrenset til, å øke ekspresjonsnivået av O-tRNA, og/eller suppressor tRNA<sub>et</sub>.

25 Unaturlige aminosyrer kan også bli kodet med sjeldne kodoner. For eksempel, når argininkonsentrasjonen i en in vitro proteinsyntesereaksjon blir redusert, har det sjeldne argininkodonet, AGG, vist seg å være effektivt for insersjon av Ala ved et syntetisk tRNA acylert med alanin. *Se, f.eks.* Ma et al., *Biochemistry*, 32:7939 (1993). I dette tilfellet, konkurrerer det syntetiske tRNA med det naturlig forekommende tRNA<sub>Arg</sub>, som  
30 eksisterer som en underordnet type i *Escherichia coli*. Noen organismer bruker ikke alle triplett-kodoner. Et utilordnet kodon AGA i *Micrococcus luteus* har blitt utnyttet for insersjon av aminosyrer i en in vitro transkripsjon/translasjon ekstrakt. *Se, f.eks.* Kowal og Oliver, *Nucl. Acid. Res.*, 25:4685 (1997). Komponenter ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli generert for å bruke disse sjeldne kodonene in vivo.

35 Selektorkodoner omfatter også forlengede kodoner, inkludert men ikke begrenset til, fire eller flere base-kodoner, slik som, fire, fem, seks eller flere base-kodoner. Eksempler på fire-base-kodoner inkluderer, men er ikke begrenset til, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU og lignende. Eksempler på fem-base-kodoner inkluderer, men er ikke begrenset til, AGGAC, CCCC, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC og lignende. Et

kjennetegn ifølge oppfinnelsen inkluderer anvendelse av forlengede kodoner basert på rammeskiftsupresjon. Fire eller flere base-kodoner kan sette inn, inkludert men ikke begrenset til, én eller mange unaturlige aminosyrer i det samme proteinet. For eksempel, i nærvær av muterte O-tRNAer, inkludert men ikke begrenset til, en spesiell rammeskift-suppressor tRNA, med antikodonsløyfer, for eksempel, med minst 8-10 nt antikodonsløyfer, blir fire eller flere base-kodonet lest som enkelt aminosyre. I andre utførelsesformer, kan antikodonsløyferne dekode, inkludert men ikke begrenset til, minst et fire-base-kodon, minst et fem-base-kodon eller minst et seks-base-kodon eller mer. Siden det er 256 mulige fire-base-kodoner, kan mange unaturlige aminosyrer bli kodet for i den samme cellen ved anvendelse av et fire eller flere base-kodon. *Se, Anderson et al., (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244; Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identifikasjon of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli, J. Mol. Biol. 307: 755-769.*

For eksempel, har fire-base-kodoner blitt brukt for å inkorporere unaturlige aminosyrer inn i proteiner ved anvendelse av in vitro biosyntetiske metoder. *Se, f.eks. Ma et al., (1993) Biochemistry, 32:7939; og Hohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:34. CGGG og AGGU ble brukt for å samtidig inkorporere 2-naftylalanin og et NBD derivat av lysin i streptavidin in vitro med to kjemisk acylerte rammeskiftsuppressor tRNAer. Se, f.eks. Hohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:12194. I en in vivo studie, undersøkte Moore et al. evnen tRNA<sup>Leu</sup>-derivatene med NCUA-antikodoner har til å undertrykke UAGN kodoner (N kan være U, A, G eller C), og fant at kvadrupletten UAGA kan bli dekodet ved et tRNA<sup>Leu</sup> med et UCUA antikodon med en effektivitet på 13 til 26 % med lite dekoding i 0 eller -1 rammen. Se, Moore et al., (2000) J. Mol. Biol., 298:195. I én utførelsesform, kan forlengede kodoner basert på sjeldne kodoner eller nonsense-kodoner bli brukt i foreliggende oppfinnelse, som kan redusere missense-gjennomlesning og rammeskiftsupresjon ved andre uønskede seter.*

For et gitt system, kan et selektorkodon også inkludere ett av de naturlige tre base-kodoner, hvor det endogene systemet ikke bruker (eller sjelden bruker) det naturlige base-kodonet. For eksempel, inkluderer dette et system som mangler et tRNA som gjenkjenner det naturlige tre base-kodonet, og/eller et system hvor tre base-kodonet er et sjeldent kodon.

Selektorkodoner inkluderer eventuelt unaturlige basepar. Disse unaturlige baseparene ekspanderer videre det eksisterende genetiske alfabetet. Ett ekstra basepar øker antallet triplett-kodoner fra 64 til 125. Egenskaper av de tredje baseparene inkluderer stabil og selektiv baseparing, effektiv enzymatisk inkorporering til DNA med høy pålitelighet ved en polymerase, og den effektive fortsatte primerforlengelse etter syntese av det begynnende unaturlige baseparet. Beskrivelse av unaturlige basepar som kan være tilpasset for fremgangsmåter og sammensetninger inkluderer, f.eks. Hirao, et al., (2002)

An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, *Nature Biotechnology*, 20:177-182. Se, også, Wu, Y., et al., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:14626-14630. Andre relevante publikasjoner er listet under.

For in vivo bruk, er det unaturlige nukleosidet membranpermeabelt og blir fosforylert for å danne det tilsvarende trifosfatet. I tillegg, er den økede genetiske informasjonen stabil og ikke ødelagt ved cellulære enzymer. Tidligere innsats ved Benner og andre tok nytte av hydrogenbindingsmønstre som er forskjellige fra de i kanoniske Watson-Crick par, det mest bemerkelsesverdige eksempel på disse er iso-C:iso-G paret. *Se, f.eks.* Switzer et al., (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8322; og Piccirilli et al., (1990) *Nature*, 343:33; Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602. Disse basene vil generelt feilpare i noe utstrekning med naturlige baser og kan ikke bli enzymatisk replikert. Kool og medarbeidere beviste at hydrofobe pakkingsvekselvirkninger mellom baser kan erstatte hydrogenbinding for å drive dannelsen av basepar. *Se*, Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602; og Guckian og Kool, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2825. I en innsats for å utvikle et unaturlig basepar som tilfredsstillende alle kravene over, har Schultz, Romesberg og medarbeidere systematisk syntetisert og studert en serie av unaturlige hydrofobe baser. Et PICS:PICS like-par er funnet å være mer stabilt enn naturlige basepar, og kan bli effektivt inkorporert i DNA ved Klenow-fragment av *Escherichia coli* DNA polymerase I (KF). *Se, f.eks.* McMinn et al., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11585-6; og Ogawa et al., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:3274. Et 3MN:3MN like-par kan bli syntetisert ved KF med effektivitet og selektivitet tilstrekkelig for biologisk funksjon. *Se, f.eks.* Ogawa et al., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:8803. Imidlertid fungerer begge baser som en kjedeterminator for videre replikering. En mutant DNA polymerase har i det siste blitt utviklet som kan bli brukt for å replikere PICS like-paret. I tillegg, kan et 7AI like-par bli replikert. *Se, f.eks.* Tae et al., (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123:7439. Et nytt metallobasepar, Dipic:Py, har også blitt utviklet, som danner et stabilt par etter binding av Cu(II). *Se*, Meggers et al., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:10714. Fordi forlengede kodoner og unaturlige kodoner i seg selv er ortogonale til naturlige kodoner, kan fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen ta nytte av denne egenskapen for å generere ortogonale tRNAer for dem.

Et translasjonelt forbiføringssystem kan også bli brukt for å inkorporere en unaturlig aminosyre i et ønsket polypeptid. I et translasjonelt forbiføringssystem, blir en stor sekvens inkorporert i et gen men blir ikke translatert inn i protein. Sekvensen inneholder en struktur som tjener som et innfallstegn for å indusere ribosomet til å hoppe over sekvensen og gjenoppta translasjon nedstrøms for insersjonen.

I visse utførelsesformer blir det interessante proteinet eller polypeptidet (eller del derav) i fremgangsmåtene og/eller sammensetninger ifølge oppfinnelsen kodet for ved en nukleinsyre. Typisk, omfatter nukleinsyren minst ett selektorkodon, minst to selektorkodoner, minst tre selektorkodoner, minst fire selektorkodoner, minst fem selektor-

kodoner, minst seks selektorkodoner, minst syv selektorkodoner, minst åtte selektorkodoner, minst ni selektorkodoner, ti eller flere selektorkodoner.

Gener som koder for interessante proteiner eller polypeptider kan bli mutagenisert ved anvendelse av fremgangsmåter kjent for en fagperson og beskrevet heri til å  
5 inkludere, for eksempel, ett eller flere selektorkodon for inkorporeringen av en unaturlig aminosyre. For eksempel, blir en nukleinsyre for et interessant protein mutagenisert til å inkludere ett eller flere selektorkodon, som sørger for inkorporeringen av én eller flere unaturlige aminosyrer. Oppfinnelsen inkluderer en hvilken som helst slik variant, inkludert men ikke begrenset til, mutante, versjoner av et hvilket som helst protein, for  
10 eksempel, inkludert minst én unaturlig aminosyre. På lignende måte inkluderer redogjørelsen også tilsvarende nukleinsyrer, dvs. en hvilken som helst nukleinsyre med ett eller flere selektorkodon som koder for én eller flere unaturlig aminosyre.

Nukleinsyremolekyler som koder for et interessant protein så som et FGF-21 polypeptid kan lett bli mutert for å introdusere et cystein ved en hvilken som helst ønsket  
15 posisjon av polypeptidet. Cystein blir vidt brukt for å introdusere reaktive molekyler, vannløselige polymerer, proteiner eller en lang rekke andre molekyler, på et interessant protein. Fremgangsmåter egnet for inkorporeringen av cystein til en ønsket posisjon av et polypeptid er kjent for fagpersonene, så som de beskrevet i U.S. patent nr. 6,608,183 og standard mutageneseteknikker.

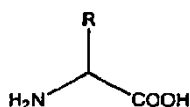
20

#### *IV. Ikke-naturlig kodede aminosyrer*

Et svært vidt mangfold av ikke-naturlig kodede aminosyrer er egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse. Et hvilket som helst antall ikke-naturlig kodede aminosyrer kan bli introdusert inn i et FGF-21 polypeptid. Generelt, er de introduserte ikke-naturlig  
25 kodede aminosyrene hovedsakelig kjemisk inerte overfor de 20 vanlige, genetisk-kodede aminosyrene (dvs. alanin, arginin, asparagin, asparginsyre, cystein, glutamin, glutaminsyre, glysin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, fenylalanin, prolin, serin, treonin, tryptofan, tyrosin og valin). I noen utførelsesformer, inkluderer de ikke-naturlig kodede aminosyrene sidekjedefunksjonelle grupper som reagerer effektivt og selektivt med  
30 funksjonelle grupper ikke funnet i de 20 vanlige aminosyrene (inkludert men ikke begrenset til, azido, keton, aldehyd og aminosygrupper) for å danne stabile konjugater. For eksempel kan et FGF-21 polypeptid som inkluderer en ikke-naturlig kodet aminosyre inneholdende en azidofunksjonell gruppe bli reagert med en polymer (inkludert men ikke begrenset til, poly(etylenglykol) eller, alternativt, et andre polypeptid inneholdende en  
35 alkyn-andel, for å danne et stabilt konjugat som resulterer for den selektive reaksjonen av azidet og de alkynfunksjonelle gruppene for å danne et Huisgen [3+2] sykloaddisjonsprodukt.

Den generiske strukturen av en alfa-aminosyre er illustrert som følger (Formel I):

## I



En ikke-naturlig kodet aminosyre er typisk en hvilken som helst struktur som har formelen listet over hvori R-gruppen er en hvilken som helst substituent annen enn én brukt i de tjue naturlige aminosyrene, og kan være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse. Fordi de ikke-naturlig kodede aminosyrene ifølge oppfinnelsen typisk avviker fra de naturlige aminosyrene bare i strukturen av sidekjeden, danner de ikke-naturlig kodede aminosyrene amidbindinger med andre aminosyrer, inkludert men ikke begrenset til, naturlig eller ikke-naturlig kodet, på samme måte som de blir dannet i naturlig forekommende polypeptider. De ikke-naturlig kodede aminosyrene har imidlertid sidekjedegrupper som skiller dem fra de naturlige aminosyrene. For eksempel, omfatter R eventuelt en alkyl-, aryl-, acyl-, keto-, azido-, hydroksyl-, hydrazin, cyano-, halo-, hydrazid, alkenyl, alkynyl, eter, tiol, seleno-, sulfonyl-, borat, boronat, fosfo, fosfono, fosfin, heterocyklisk, enon, imin, aldehyd, ester, tiosyre, hydroksylamin, aminogruppe, eller lignende eller en hvilken som helst kombinasjon derav. Andre interessante ikke-naturlig forekommende aminosyrer som kan være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse inkluderer, men er ikke begrenset til, aminosyrer omfattende en fotoaktiverbar kryss-binder, spinn-merkede aminosyrer, fluorescente aminosyrer, metallbindende aminosyrer, metall-holdige aminosyrer, radioaktive aminosyrer, aminosyrer med nye funksjonelle grupper, aminosyrer som kovalent eller ikke-kovalent vekselvirker med andre molekyler, fotoaktiverbar og/eller fotoisomeriserbare aminosyrer, aminosyrer omfattende biotin eller en biotinanalog, glykosylerte aminosyrer så som en sukkersubstituert serin, andre karbohydratmodifiserte aminosyrer, keto-holdige aminosyrer, aminosyrer omfattende polyetylenglykol eller polyeter, tungt atom substituerte aminosyrer, kjemisk spaltbare og/eller fotospaltbare aminosyrer, aminosyrer med en forlenget sidekjede sammenlignet med naturlige aminosyrer, inkludert men ikke begrenset til, polyetere eller lang kjede hydrokarboner, inkludert men ikke begrenset til, mer enn omkring 5 eller mer enn omkring 10 karboner, karbon-sammenknyttede sukkerholdige aminosyrer, redoks-aktive aminosyrer, amino tiosyre-holdige aminosyrer og aminosyrer omfattende én eller flere toksisk(e) andel(er).

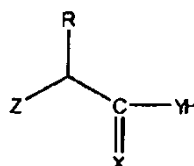
Eksempelvis ikke-naturlig kodede aminosyrer som kan være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse og som er nyttige for reaksjoner med vannløselige polymerer inkluderer, men er ikke begrenset til, de med karbonyl, aminooksy, hydrazin, hydrazid, semikarbamid, azid og alkyn reaktive grupper. I noen utførelsesformer, omfatter ikke-naturlig kodede aminosyrer en sakkarid-andel. Eksempler på slike aminosyrer inkluderer *N*-acetyl-L-glukosaminyl-L-serin, *N*-acetyl-L-galaktosaminyl-L-serin, *N*-acetyl-L-glukosaminyl-L-treonin, *N*-acetyl-L-glukosaminyl-L-asparagin og *O*-mannosaminyl-L-

serin. Eksempler på slike aminosyrer inkluderer også eksempler hvor den naturlig-forekommende N- eller O-bindingen mellom aminosyren og sakkaridet er erstattet ved en kovalent binding som ikke vanligvis blir funnet i naturen - inkludert men ikke begrenset til, et alken, et oksim, en tioeter, et amid og lignende. Eksempler på slike aminosyrer inkluderer også sakkarider som ikke vanligvis blir funnet i naturlig-forekommende proteiner så som 2-deoksy-glukose, 2-deoksygalaktose og lignende.

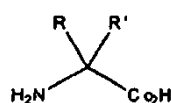
Mange av de ikke-naturlig kodede aminosyrene tilveiebrakt heri er kommersielt tilgjengelige, f.eks. fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Novabiochem (en divisjon av EMD Biosciences, Darmstadt, Tyskland) eller Peptech (Burlington, MA, USA). De som ikke er kommersielt tilgjengelige blir eventuelt syntetisert som tilveiebrakt heri eller ved anvendelse av standard metoder kjent for fagpersonene. For organiske synteseteknikker, se, f.eks. Organic Chemistry av Fessenden og Fessenden, (1982, andre utgave, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry av Mars (tredje utgave, 1985, Wiley and Sons, New York); og Advanced Organic Chemistry av Carey og Sundberg (tredje utgave, delene A og B, 1990, Plenum Press, New York). *Se, også*, U.S. patenter nr. 7,045,337 og 7,083,970.

I tillegg til unaturlige aminosyrer som inneholder nye sidekjeder, omfatter unaturlige aminosyrer som kan være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse også eventuelt modifisert-rygggrad-strukturer, inkludert men ikke begrenset til, som illustrert ved strukturene ifølge Formel II og III:

II



III



hvor Z typisk omfatter OH, NH<sub>2</sub>, SH, NH-R' eller S-R'; X og Y, som kan være de samme eller forskjellige, omfatter typisk S eller O, og R og R', som eventuelt er de samme eller forskjellige, blir typisk valgt fra den samme listen av bestanddeler for R-gruppen beskrevet over for de unaturlige aminosyrene som har Formel I så vel som hydrogen. For eksempel, omfatter unaturlige aminosyrer ifølge oppfinnelsen eventuelt substitusjoner i amino- eller karboksylgruppen som illustrert ved Formlene II og III. Unaturlige aminosyrer av denne typen inkluderer, men er ikke begrenset til, α-hydroksysyrer, α-tiosyrer, α-aminotiokarboksylater, inkludert men ikke begrenset til, med sidekjeder tilsvarende de vanlige tjue naturlige aminosyrene eller unaturlige sidekjeder. I tillegg inkluderer substitusjoner ved α-karbonet eventuelt, men er ikke begrenset til, L, D eller α-α-disubstituerte aminosyrer så som D-glutamat, D-alanin, D-metyl-O-tyrosin, aminosmør-

syre og lignende. Andre strukturelle alternativer inkluderer cycliske aminosyrer, så som prolinanaloger så vel som 3, 4, 6, 7, 8 og 9-leddet ring prolinanaloger,  $\beta$  og  $\gamma$  aminosyrer så som substituert  $\beta$ -alanin og  $\gamma$ -amino smørsyre.

Mange unaturlige aminosyrer er basert på naturlige aminosyrer, så som tyrosin, glutamin, fenylyalanin og lignende, og er egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse. Tyrosinanaloger inkluderer, men er ikke begrenset til, para-substituerte tyrosiner, orto-substituerte tyrosiner og meta-substituerte tyrosiner, hvor det substituerte tyrosinet omfatter, inkludert men ikke begrenset til, en ketogruppe (inkludert men ikke begrenset til, en acetylgruppe), en benzoylgruppe, en aminogruppe, et hydrazin, et hydroksyamin, en tiolgruppe, en karboksygruppe, en isopropylgruppe, en metylgruppe, et  $C_6 - C_{20}$  lineær kjede eller forgrenet hydrokarbon, et mettet eller umettet hydrokarbon, en O-metylgruppe, en polyetergruppe, en nitrogruppe, en alkynylgruppe eller lignende. I tillegg, er multippelt substituerte arylinger også vurdert. Glutaminanaloger som kan være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse inkluderer, men er ikke begrenset til,  $\alpha$ -hydroksyderivater,  $\gamma$ -substituerte derivater, cycliske derivater og amidsubstituerte glutaminderivater. Eksempel på fenylyalaninanaloger som kan være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse inkluderer, men er ikke begrenset til, para-substituerte fenylyalaniner, orto-substituerte fenylyalaniner og meta-substituerte fenylyalaniner, hvor substituenten omfatter, inkludert men ikke begrenset til, en hydroksygruppe, en metoksygruppe, en metylgruppe, en allylgruppe, et aldehyd, en azido, en jod, en brom, en ketogruppe (inkludert men ikke begrenset til, en acetylgruppe), en benzoyl, en alkynylgruppe eller lignende. Spesifikke eksempler på unaturlige aminosyrer som kan være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse inkluderer, men er ikke begrenset til, en p-acetyl-L-fenylyalanin, en O-metyl-L-tyrosin, en L-3-(2-naftyl)alanin, en 3-metyl-fenylyalanin, en O-4-allyl-L-tyrosin, en 4-propyl-L-tyrosin, en tri-O-acetyl-GlcNAc $\beta$ -serin, en L-Dopa, en fluorert fenylyalanin, en isopropyl-L-fenylyalanin, en p-azido-L-fenylyalanin, en p-acyl-L-fenylyalanin, en p-benzoyl-L-fenylyalanin, en L-fosfoserin, en fosfonoserin, en fosfontyrosin, en p-jod-fenylyalanin, en p-bromfenylyalanin, en p-amino-L-fenylyalanin, en isopropyl-L-fenylyalanin og en p-propargyloksy-fenylyalanin og lignende. Eksempler på strukturer av et mangfold av unaturlige aminosyrer som kan være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse er tilveiebrakt i, for eksempel, WO 2002/085923 med tittel "In vivo incorporation of unnatural amino acids." Se også Kiick et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24 for ytterligere metioninanaloger. Internasjonal søknad nr. PCT/US06/47822 med tittel "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides," beskriver reduktiv alkylering av en aromatisk aminandeler, inkludert men ikke begrenset til, p-aminofenylyalanin og reduktiv aminering.

I én utførelsesform, er sammensetninger av et FGF-21 polypeptid som inkluderer en unaturlig aminosyre (slik som p-(propargyloksy)-fenylyalanin) tilveiebrakt. Ulike

sammensetninger omfattende *p*-(propargyloksy)-fenylalanin og, inkludert men ikke begrenset til, proteiner og/eller celler, er også tilveiebrakt. I ett aspekt inkluderer en sammensetning som inkluderer den *p*-(propargyloksy)-fenylalanin unaturlige aminosyren, videre et ortogonalt tRNA. Den unaturlige aminosyren kan være bundet (inkludert men 5 ikke begrenset til, kovalent) til det ortogonale tRNA, inkludert men ikke begrenset til, kovalent bundet til det ortogonale tRNA ved en aminoacylbinding, kovalent bundet til en 3'OH eller en 2'OH av en terminal ribosesukker av det ortogonale tRNA, etc.

De kjemiske andelene via unaturlige aminosyrer som kan bli inkorporert i proteiner tilbyr et mangfold av fordeler og manipulasjoner av proteinet. For eksempel tillater den 10 unike reaktiviteten av en keto-funksjonell gruppe selektiv modifikasjon av proteiner med en hvilket som helst av flere hydrazin- eller hydroksylamin-holdige reagenser in vitro og in vivo. En tungt atom unaturlig aminosyre, kan for eksempel være nyttig for innfasing av røntgenstrukturdata. Den sete-spesifikke introduksjonen av tunge atomer ved anvendelse av unaturlige aminosyrer tilveiebringer også selektivitet og fleksibilitet i valg av 15 posisjoner for tunge atomer. Fotoreaktive unaturlige aminosyrer (inkludert men ikke begrenset til, aminosyrer med benzofenon og arylazider (inkludert men ikke begrenset til, fenylazid) sidekjeder), for eksempel, sørger for effektiv in vivo og in vitro fotokryssbinding av protein. Eksempler på fotoreaktive unaturlige aminosyrer inkluderer, men er ikke begrenset til, *p*-azido-fenylalanin og *p*-benzoyl-fenylalanin. Proteinene med de 20 fotoreaktive unaturlige aminosyrene kan så bli kryssbundet som man ønsker ved eksitasjon av den fotoreaktive gruppen- noe som tilveiebringer tidvis kontroll. I ett eksempel, kan metylgruppen av en unaturlig amino være substituert med en isotopisk merket, inkludert men ikke begrenset til, metylgruppe, som en probe av lokal struktur og dynamikk, inkludert men ikke begrenset til, med anvendelsen av kjernemagnetisk 25 resonans og vibrasjonsspektroskopi. Alkynyl eller azidofunksjonelle grupper, for eksempel, tillater den selektive modifikasjonen av proteiner med molekyler ved en [3+2] sykloaddisjonsreaksjon.

En ikke-naturlig aminosyre inkorporert inn i et polypeptid ved aminotermi- nusen kan være sammensatt av en R-gruppe som er en hvilken som helst substituent annen enn 30 én brukt i de tjue naturlige aminosyrene og en 2. reaktive gruppe forskjellig fra NH<sub>2</sub>-gruppen som normalt foreligger i  $\alpha$ -aminosyrer (se Formel I). En lignende ikke-naturlig aminosyre kan være inkorporert ved karboksylterminusen med en 2. reaktive gruppe forskjellig fra COOH-gruppen som normalt foreligger i  $\alpha$ -aminosyrer (se Formel I).

De unaturlige aminosyrene ifølge oppfinnelsen kan bli valgt eller designet for å 35 tilveiebringe ytterligere karakteristikk som er utilgjengelige i de tjue naturlige aminosyrene. For eksempel, kan unaturlig aminosyre eventuelt være designet eller valgt for å modifisere de biologiske egenskapene av et protein, f.eks. som de blir inkorporert i. For eksempel kan de følgende egenskapene eventuelt bli modifisert ved inkludering av en unaturlig aminosyre i et protein: toksisitet, biologisk fordeling, løselighet, stabilitet, f.eks.



termisk, hydrolytisk, oksidativ, resistens overfor enzymatisk nedbrytning, og lignende, enkel rensing og prosessering, strukturelle egenskaper, spektroskopiske egenskaper, kjemiske og/eller fotokjemiske egenskaper, katalytisk aktivitet, redoks potensiale, halveringstid, evne til å reagere med andre molekyler, f.eks. kovalent eller ikke-kovalent og lignende.

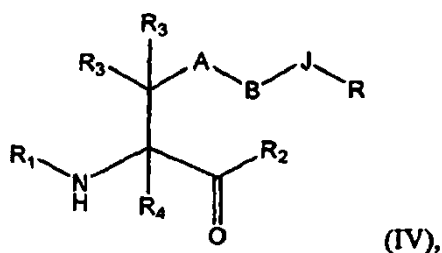
#### STRUKTUR OG SYNTSE AV IKKE-NATURLIGE AMINOSYRER: KARBONYL, KARBONYL-LIGNENDE, MASKERT KARBONYL, BESKYTTEDE KARBONYLGRUPPER OG HYDROKSYLAMINGRUPPER

10 I noen utførelsesformer tilveiebringer foreliggende oppfinnelse FGF-21 knyttet til en vannløselig polymer, f.eks. en PEG, ved en oksimbinding.

Mange typer av ikke-naturlig kodete aminosyrer er egnet for dannelse av oksimbindinger. Disse inkluderer, men er ikke begrenset til, ikke-naturlig kodete aminosyrer inneholdende en karbonyl-, dikarbonyl- eller hydroksylamingruppe. Slike aminosyrer er beskrevet i U.S. patentpublikasjoner nr. 2006/0194256, 2006/0217532 og 2006/0217289 og WO 2006/069246 med tittel "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides,". Ikke-naturlig kodete aminosyrer er også beskrevet i U.S. patent nr. 7,083,970 og U.S. patent nr. 7,045,337, som er inkorporert ved referanse heri i deres helhet.

20 Noen utførelsesformer av oppfinnelsen utnytter FGF-21 polypeptider som er substituert ved én posisjon med en para-acetylfenylalanin aminosyre. Syntesen av p-acetyl-(+/-)-fenylalanin og m-acetyl-(+/-)-fenylalanin er beskrevet i Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003). Andre karbonyl- eller dikarbonyl-holdige aminosyrer kan på lignende måte bli fremstilt av en fagperson innen faget. Videre, ikke-begrensede eksempelvis synteses av ikke-naturlig aminosyre som er inkludert heri er presentert i FIG. 4, 24-34 og 36-39 av U.S. patent nr. 7,083,970.

Aminosyrer med en elektrofil reaktiv gruppe sørger for et mangfold av reaksjoner for å knytte molekyler sammen via nukleofile addisjonsreaksjoner blant andre. Slike elektrofile reaktive grupper inkluderer en karbonylgruppe (inkludert en ketogruppe og en dikarbonylgruppe), en karbonyl-lignende gruppe (som har reaktivitet lignende en karbonylgruppe (inkludert en ketogruppe og en dikarbonylgruppe) og er strukturelt lignende en karbonylgruppe), en maskert karbonylgruppe (som lett kan bli omformet til en karbonylgruppe (inkludert en ketogruppe og en dikarbonylgruppe)), eller en beskyttet karbonylgruppe (som har reaktivitet lignende en karbonylgruppe (inkludert en ketogruppe og en dikarbonylgruppe) etter avbeskyttelse). Slike aminosyrer inkluderer aminosyrer som har strukturen ifølge Formel (IV):

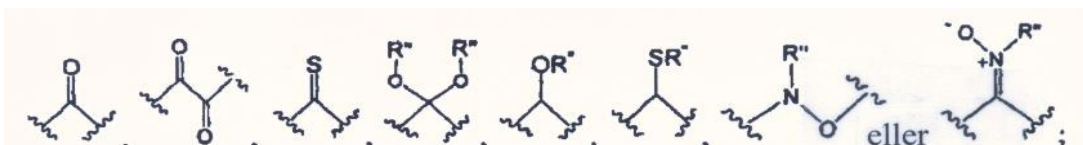


hvor:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

B er valgfri, og er når den foreligger en linker valgt fra gruppen bestående av lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S(O)<sub>k</sub>- hvor k er 1, 2 eller 3, -S(O)<sub>k</sub>(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- og -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

J er



R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

hver R'' er uavhengig H, alkyl, substituert alkyl eller en beskyttende gruppe, eller når mer enn én R'' gruppe foreligger, danner eventuelt to R'' en heterosykloalkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

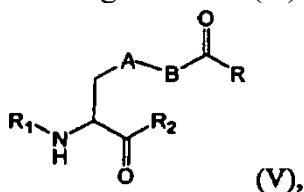
hver av R<sub>3</sub> og R<sub>4</sub> er uavhengig H, halogen, lavere alkyl eller substituert lavere alkyl, eller R<sub>3</sub> og R<sub>4</sub> eller to R<sub>3</sub> grupper danner eventuelt en sykloalkyl eller en heterosykloalkyl;

eller -A-B-J-R gruppene danner sammen en bicyklisk eller tricyklisk sykloalkyl eller heterosykloalkyl omfattende minst én karbonylgruppe, inkludert en dikarbonylgruppe, beskyttet karbonylgruppe, inkludert en beskyttet dikarbonylgruppe, eller maskert karbonylgruppe, inkludert en maskert dikarbonylgruppe;

5 eller -J-R gruppen danner sammen en monocyklisk eller bicyklisk sykloalkyl eller heterosykloalkyl omfattende minst én karbonylgruppe, inkludert en dikarbonylgruppe, beskyttet karbonylgruppe, inkludert en beskyttet dikarbonylgruppe, eller maskert karbonylgruppe, inkludert en maskert dikarbonylgruppe;

med et forbehold at når A er fenylen og hver R<sub>3</sub> er H, foreligger B; og at når A er  
10 -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- og hver R<sub>3</sub> er H, er B ikke -NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-; og at når A og B er fraværende og hver R<sub>3</sub> er H, er R ikke metyl.

I tillegg, er det å ha strukturen ifølge Formel (V) inkludert:



hvor:

15 A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen,  
20 aralkylen eller substituert aralkylen;

B er valgfri, og er når den foreligger en linker valgt fra gruppen bestående av lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S(O)<sub>k</sub>- hvor k er 1, 2 eller 3, -S(O)<sub>k</sub>(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-,  
25 -NR'-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-,  
30 -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- og -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

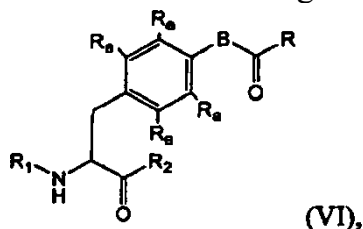
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

35 R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

$R_2$  er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

med et forbehold at når A er fenylen, foreligger B; og at når A er  $-(CH_2)_4-$ , er B ikke  $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ ; og at når A og B er fraværende, er R ikke metyl.

I tillegg, er aminosyrer som har strukturen ifølge Formel (VI) inkludert:



hvor:

B er en linker valgt fra gruppen bestående av lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen)- $S(O)_k$ - hvor k er 1, 2 eller 3,  $S(O)_k$ (alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O) $_k$ N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O) $_k$ N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R') $_2$ -N=N- og -C(R') $_2$ -N(R')-N(R')-, hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

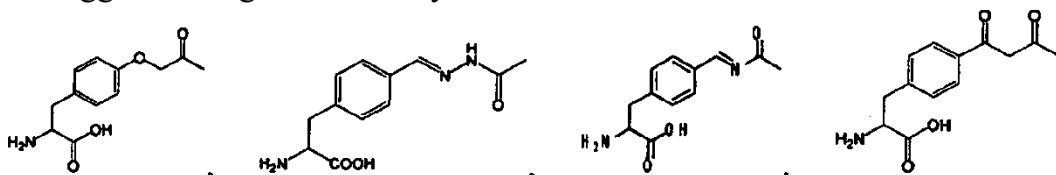
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

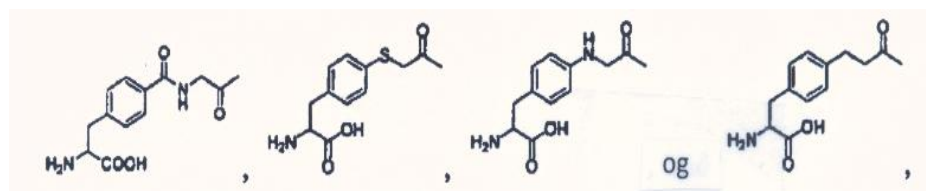
$R_1$  er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

$R_2$  er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

hver  $R_a$  er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, halogen, alkyl, substituert alkyl,  $-N(R')_2$ ,  $-C(O)_kR'$  hvor k er 1, 2 eller 3,  $-C(O)N(R')_2$ , -OR' og  $-S(O)_kR'$ , hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl.

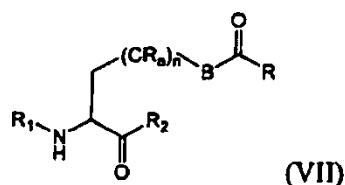
I tillegg er de følgende aminosyrer inkludert:





hvor i slike forbindelser er eventuelt aminobeskyttet gruppe, karboksylbeskyttet eller et salt derav. I tillegg kan en hvilken som helst av de følgende ikke-naturlige aminosyrene være inkorporert i et ikke-naturlig aminosyre polypeptid.

5 I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (VII) inkludert:



hvor i

B er valgfri, og er når den foreligger en linker valgt fra gruppen bestående av  
 10 lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen eller substituert alkylen), -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S(O)<sub>k</sub>- hvor k er 1, 2 eller 3, -S(O)<sub>k</sub>(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-,  
 15 -NR'-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller substituert alkylen), -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- og -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, hvor hver  
 20 R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

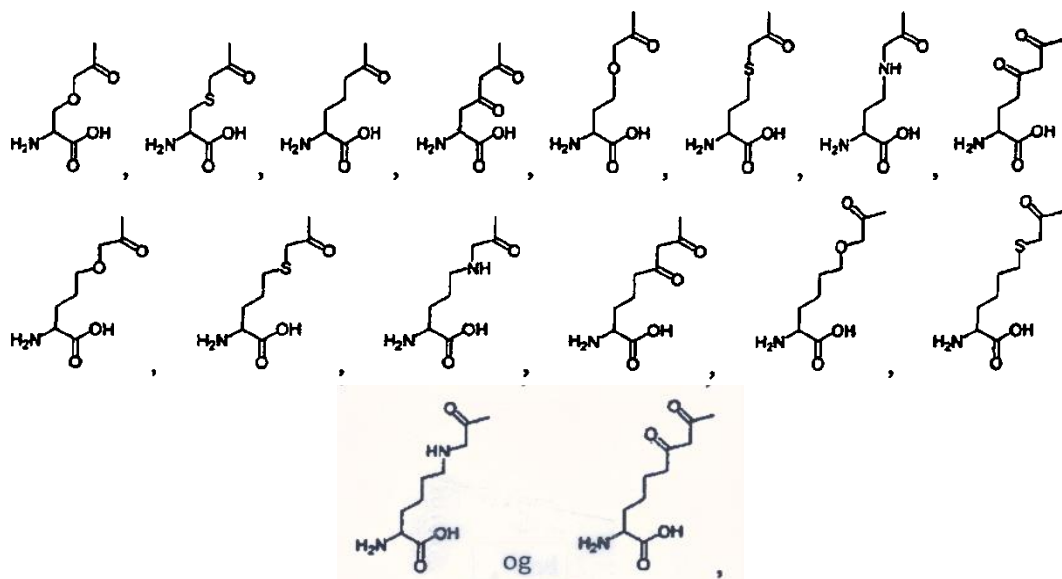
R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks,  
 25 aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

hver R<sub>a</sub> er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, halogen, alkyl, substituert alkyl, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' hvor k er 1, 2 eller 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' og -S(O)<sub>k</sub>R', hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl; og n er 0 til 8;

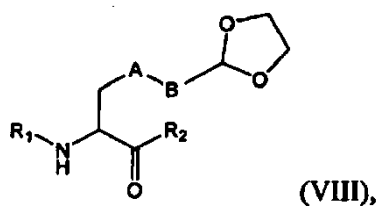
med et forbehold at når A er -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, er B ikke -NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-

30 I tillegg er de følgende aminosyrene inkludert:



5 hvori slike forbindelser er eventuelt aminobeskyttet, eventuelt karboksylbeskyttet, eventuelt aminobeskyttet og karboksylbeskyttet, eller et salt derav. I tillegg, kan disse ikke-naturlige aminosyrene og en hvilken som helst av de følgende ikke-naturlige aminosyrene være inkorporert i et ikke-naturlig aminosyre polypeptid.

I tillegg, er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (VIII) inkludert:



10 hvori

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

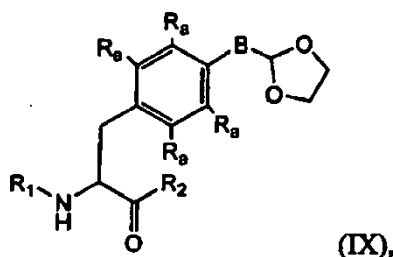
15 B er valgfri, og er når den foreligger en linker valgt fra gruppen bestående av lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen eller substituert alkylen), -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S(O)<sub>k</sub>- hvor k er 1, 2 eller 3, -S(O)<sub>k</sub>(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-,

-N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-,  
-C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- og -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, hvor hver  
R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks,  
aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks,  
aminosyre, polypeptid eller polynukleotid.

I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (IX)  
inkludert:



B er valgfri, og er når den foreligger en linker valgt fra gruppen bestående av  
lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere  
alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen  
eller substituert alkylen)-, -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S(O)<sub>k</sub>- hvor k  
er 1, 2 eller 3, -S(O)<sub>k</sub>(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen  
eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-,  
-NR'-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller  
substituert alkylen)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-,  
-N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-,  
-N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-,  
-C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- og -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, hvor hver  
R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

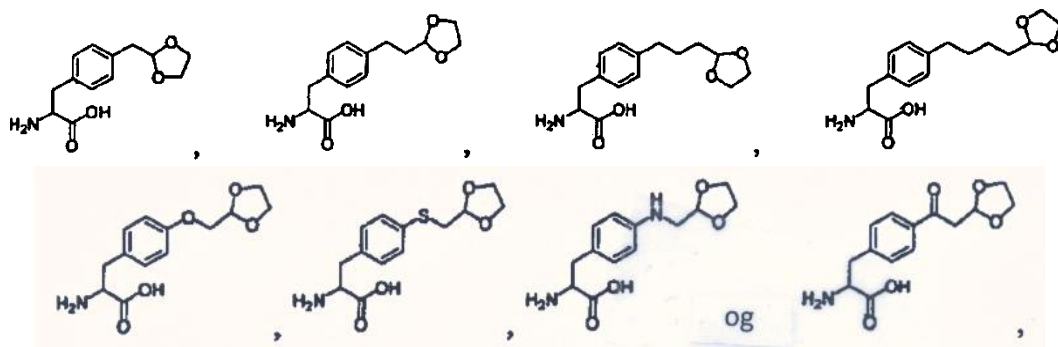
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks,  
aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks,  
aminosyre, polypeptider eller polynukleotid;

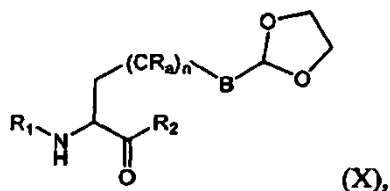
hvor i hver R<sub>a</sub> er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, halogen, alkyl,  
substituert alkyl, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' hvor k er 1, 2 eller 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' og -  
S(O)<sub>k</sub>R', hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl.

I tillegg er de følgende aminosyrene inkludert:



hvor i slike forbindelser er eventuelt aminobeskyttet, eventuelt karboksylbeskyttet, eventuelt aminobeskyttet og karboksylbeskyttet, eller et salt derav. I tillegg, kan disse ikke-naturlige aminosyrene og en hvilken som helst av de følgende ikke-naturlige aminosyrene være inkorporert i et ikke-naturlig aminosyre polypeptid.

I tillegg, er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (X) inkludert:



hvor i B er valgfri, og er når den foreligger en linker valgt fra gruppen bestående av lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen eller substituert alkylen, -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen, -S(O)<sub>k</sub>- hvor k er 1, 2 eller 3, -S(O)<sub>k</sub>(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen eller substituert alkylen, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- og -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

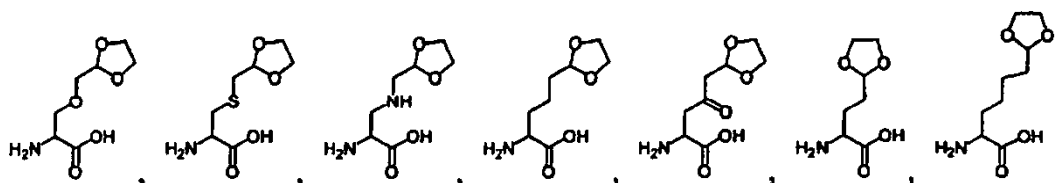
R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

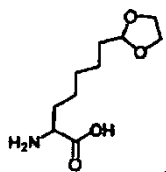
hver R<sub>a</sub> er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, halogen, alkyl, substituert alkyl, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' hvor k er 1, 2 eller 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' og -S(O)<sub>k</sub>R', hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl; og n er 0 til 8.

I tillegg er de følgende aminosyrene inkludert:





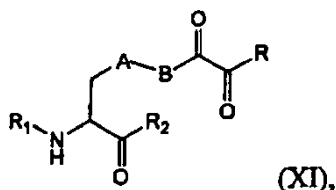
og



hvor i slike forbindelser er eventuelt aminobeskyttet, eventuelt karboksylbeskyttet, eventuelt aminobeskyttet og karboksylbeskyttet, eller et salt derav. I tillegg, kan disse ikke-naturlige aminosyrene og en hvilken som helst av de følgende ikke-naturlige aminosyrene være inkorporert i et ikke-naturlig aminosyre polypeptid.

I tillegg til monokarbonylstrukturer, kan de ikke-naturlige aminosyrene beskrevet heri inkludere grupper så som dikarbonyl, dikarbonyl-lignende, maskert dikarbonyl og beskyttede dikarbonylgrupper.

For eksempel er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XI) inkludert:



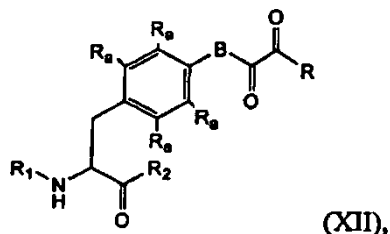
hvor i A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen; B er valgfri, og er når den foreligger en linker valgt fra gruppen bestående av lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S(O)<sub>k</sub>- hvor k er 1, 2 eller 3, -S(O)<sub>k</sub>(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller substituert alkylen), -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- og -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

$R_1$  er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

$R_2$  er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid.

5 I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XII) inkludert:



B er valgfri, og er når den foreligger en linker valgt fra gruppen bestående av lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen), -S(O)<sub>k</sub>- hvor k er 1, 2 eller 3, -S(O)<sub>k</sub>(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-M=N- og -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

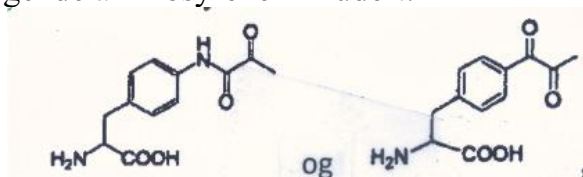
20 R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

$R_1$  er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

$R_2$  er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

25 hvori hver  $R_a$  er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, halogen, alkyl, substituert alkyl, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' hvor k er 1, 2 eller 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' og -S(O)<sub>k</sub>R', hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl.

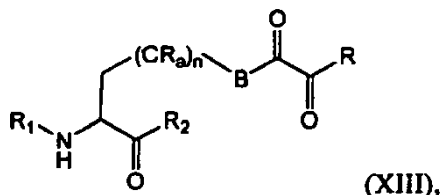
I tillegg er de følgende aminosyrene inkludert:



30 hvori slike forbindelser er eventuelt aminobeskyttet, eventuelt karboksylbeskyttet, eventuelt aminobeskyttet og karboksylbeskyttet, eller et salt derav. I tillegg, kan disse

ikke-naturlige aminosyre og en hvilken som helst av de følgende ikke-naturlige aminosyre være inkorporert i et ikke-naturlig aminosyre polypeptid.

I tillegg er de følgende aminosyre som har strukturen ifølge Formel (XIII) inkludert:



5 hvori B er valgfri, og er når den foreligger en linker valgt fra gruppen bestående av lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, lavere heteroalkylen, substituert lavere heteroalkylen, -O-, -O-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S-, -S-(alkylen eller substituert alkylen)-, -S(O)<sub>k</sub>- hvor k er 1, 2 eller 3, -S(O)<sub>k</sub>(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen eller substituert alkylen)-, -C(S)-, -C(S)-  
10 (alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen eller substituert alkylen), -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')CO-(alkylen eller substituert alkylen)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- og -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, hvor  
15 hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl;

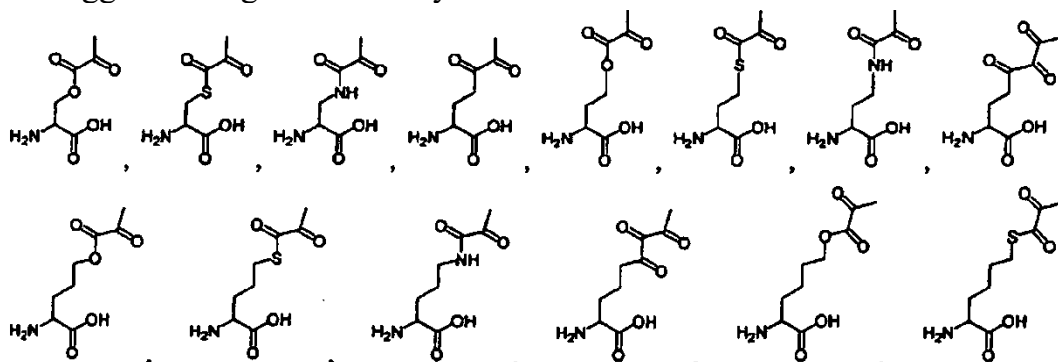
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

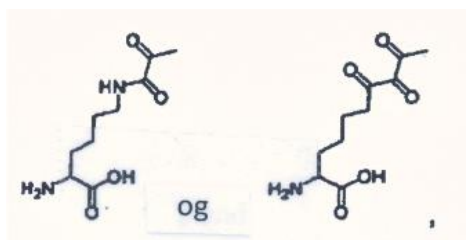
R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

20 R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

hver R<sub>a</sub> er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, halogen, alkyl, substituert alkyl, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' hvor k er 1, 2 eller 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' og -S(O)<sub>k</sub>R', hvor hver R' er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl; og n er 0 til 8.

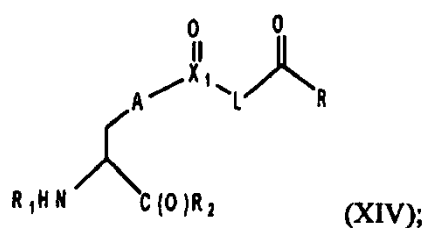
25 I tillegg er de følgende aminosyre inkludert:





hvor slike forbindelser er eventuelt aminobeskyttet, eventuelt karboksylbeskyttet, eventuelt aminobeskyttet og karboksylbeskyttet, eller et salt derav. I tillegg, kan disse ikke-naturlige aminosyrene og en hvilken som helst av de følgende ikke-naturlige aminosyrene være inkorporert i et ikke-naturlig aminosyre polypeptid.

I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XIV) inkludert:



hvor:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

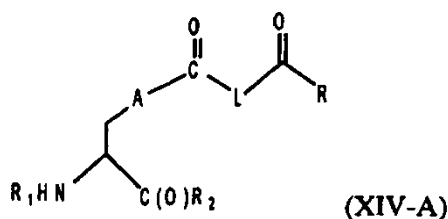
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

X<sub>1</sub> er C, S eller S(O); og L er alkylen, substituert alkylen, N(R')(alkylen) eller N(R')(substituert alkylen), hvor R' er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl.

I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XIV-A) inkludert:



hvor:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

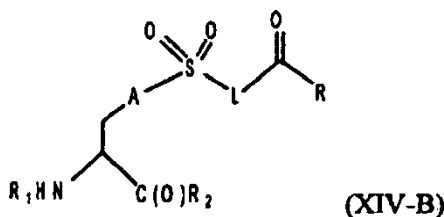
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

L er alkylen, substituert alkylen, N(R')(alkylen) eller N(R')(substituert alkylen), hvor R' er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl.

I tillegg, er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XIV-B) inkludert:



hvor:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

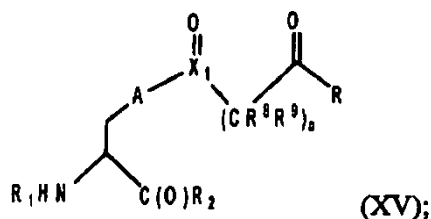
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

L er alkylen, substituert alkylen, N(R')(alkylen) eller N(R')(substituert alkylen), hvor R' er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl.

I tillegg, er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XV) inkludert:



hvor:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

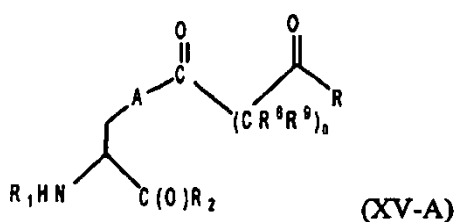
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

X<sub>1</sub> er C, S eller S(O); og n er 0, 1, 2, 3, 4 eller 5; og hver R<sup>8</sup> og R<sup>9</sup> på hver CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> gruppe er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, alkoksy, alkylamin, halogen, alkyl, aryl eller en hvilken som helst R<sup>8</sup> og R<sup>9</sup> kan sammen danne =O eller en sykloalkyl, eller hvilke som helst to tilgrensende R<sup>8</sup> grupper kan sammen danne en sykloalkyl.

I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XV-A) inkludert:



hvor:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

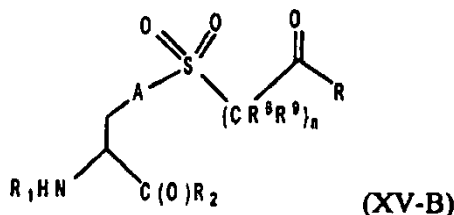
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

$R_2$  er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

$n$  er 0, 1, 2, 3, 4 eller 5; og hver  $R^8$  og  $R^9$  på hver  $CR^8R^9$  gruppe er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, alkoksy, alkylamin, halogen, alkyl, aryl eller en hvilken som helst  $R^8$  og  $R^9$  kan sammen danne =O eller en sykloalkyl, eller hvilke som helst to tilgrensende  $R^8$  grupper kan sammen danne en sykloalkyl.

I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XV-B) inkludert:



10 hvori:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

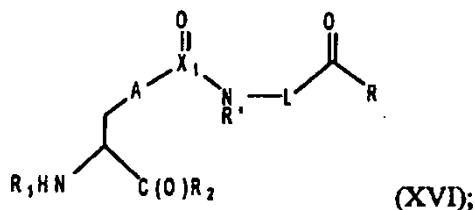
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

$R_1$  er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

20  $R_2$  er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

$n$  er 0, 1, 2, 3, 4 eller 5; og hver  $R^8$  og  $R^9$  på hver  $CR^8R^9$  gruppe er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, alkoksy, alkylamin, halogen, alkyl, aryl eller en hvilken som helst  $R^8$  og  $R^9$  kan sammen danne =O eller en sykloalkyl, eller hvilke som helst to tilgrensende  $R^8$  grupper kan sammen danne en sykloalkyl.

I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XVI) inkludert:



hvor:

30 A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert

lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

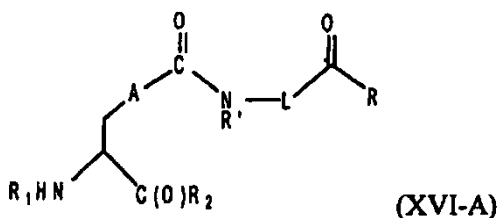
5 R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

10 X<sub>1</sub> er C, S eller S(O); og L er alkylene, substituert alkylene, N(R')(alkylene) eller N(R')(substituert alkylene), hvor R' er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl.

I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XVI-A) inkludert:



15 hvori:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylene, substituert lavere alkylene, lavere sykloalkylene, substituert lavere sykloalkylene, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylene, substituert heteroalkylene, lavere heterosykloalkylene, substituert lavere heterosykloalkylene, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylene eller substituert aralkylene;

R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

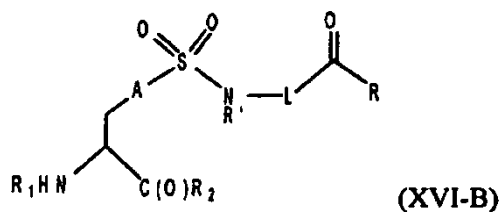
20 R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

L er alkylene, substituert alkylene, N(R')(alkylene) eller N(R')(substituert alkylene), hvor R' er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl.

30 I tillegg er de følgende aminosyrene som har strukturen ifølge Formel (XVI-B) inkludert:





hvor:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

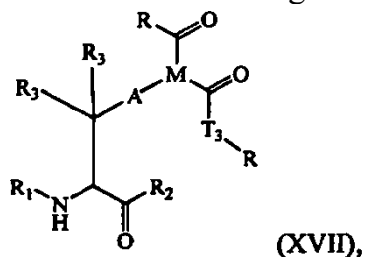
R er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

R<sub>1</sub> er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

R<sub>2</sub> er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

L er alkylen, substituert alkylen, N(R')(alkylen) eller N(R')(substituert alkylen), hvor R' er H, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl.

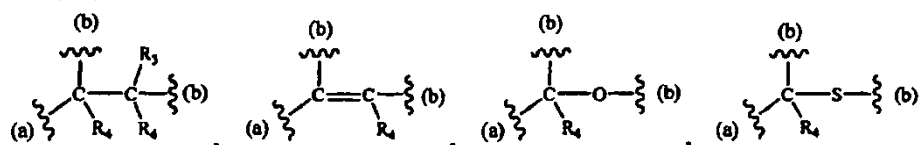
I tillegg er aminosyrer som har strukturen ifølge Formel (XVII) inkludert:

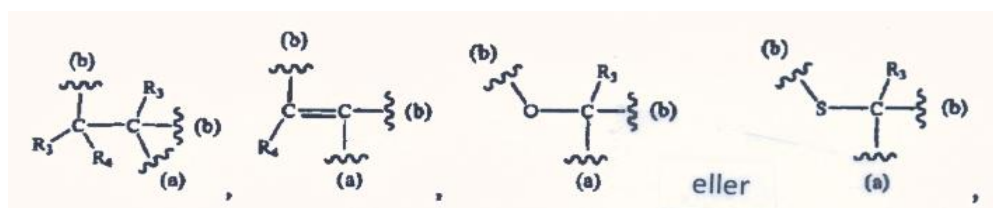


hvor:

A er valgfri, og er når den foreligger lavere alkylen, substituert lavere alkylen, lavere sykloalkylen, substituert lavere sykloalkylen, lavere alkenylen, substituert lavere alkenylen, alkynylen, lavere heteroalkylen, substituert heteroalkylen, lavere heterosykloalkylen, substituert lavere heterosykloalkylen, arylen, substituert arylen, heteroarylen, substituert heteroarylen, alkarylen, substituert alkarylen, aralkylen eller substituert aralkylen;

M er -C(R<sub>3</sub>)-,





hvor (a) indikerer binding til A-gruppen og (b) indikerer binding til respektive karbonylgrupper,  $R_3$  og  $R_4$  er uavhengig valgt fra H, halogen, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl, eller  $R_3$  og  $R_4$  eller to  $R_3$  grupper eller to  $R_4$  grupper danner eventuelt en sykloalkyl eller en heterosykloalkyl;

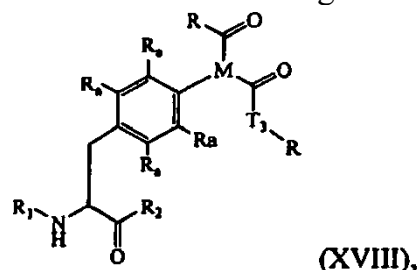
$R$  er H, halogen, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

$T_3$  er en binding,  $C(R)(R)$ , O eller S, og  $R$  er H, halogen, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

$R_1$  er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

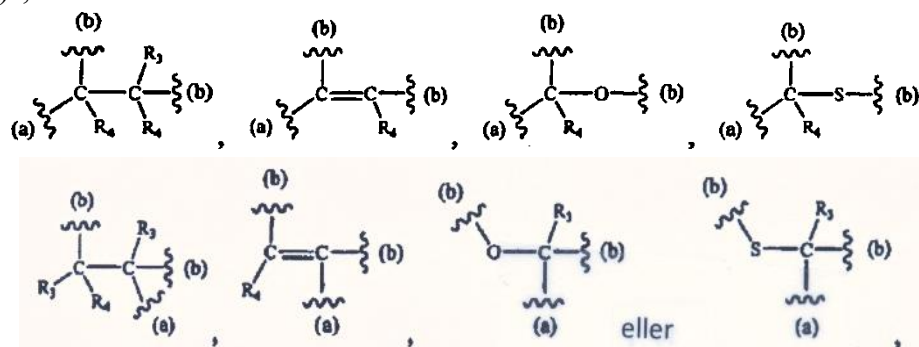
$R_2$  er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid.

I tillegg er aminosyrer som har strukturen ifølge Formel (XVIII) inkludert:



hvor:

$M$  er  $-C(R_3)-$ ,



hvor (a) indikerer binding til A-gruppen og (b) indikerer binding til respektive karbonylgrupper,  $R_3$  og  $R_4$  er uavhengig valgt fra H, halogen, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl, eller  $R_3$  og  $R_4$  eller to  $R_3$  grupper eller to  $R_4$  grupper eventuelt danner en sykloalkyl eller en heterosykloalkyl;

$R$  er H, halogen, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

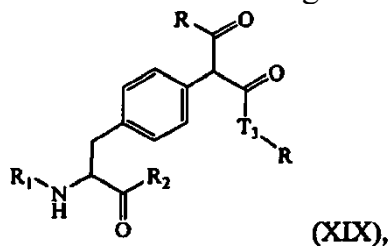
$T_3$  er en binding,  $C(R)(R)$ , O eller S, og  $R$  er H, halogen, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl;

$R_1$  er valgfri, og er når den foreligger, H, en aminobeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid; og

$R_2$  er valgfri, og er når den foreligger, OH, en esterbeskyttende gruppe, harpiks, aminosyre, polypeptid eller polynukleotid;

- 5 hver  $R_a$  er uavhengig valgt fra gruppen bestående av H, halogen, alkyl, substituert alkyl,  $-N(R')_2$ ,  $-C(O)_kR'$  hvor k er 1, 2 eller 3,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-OR'$  og  $-S(O)_kR'$ , hvor hver  $R'$  er uavhengig H, alkyl eller substituert alkyl.

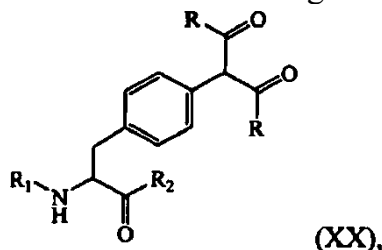
I tillegg er aminosyrer som har strukturen ifølge Formel (XIX) inkludert:



- 10 hvori:

R er H, halogen, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl; og  $T_3$  er O, eller S.

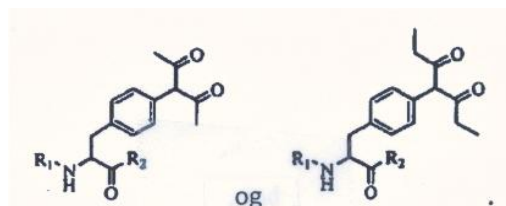
I tillegg, er aminosyrer som har strukturen ifølge Formel (XX) inkludert:



- 15 hvori:

R er H, halogen, alkyl, substituert alkyl, sykloalkyl eller substituert sykloalkyl.

I tillegg, er de følgende aminosyrer som har strukturer ifølge Formel (XXI) inkludert:



- 20 I noen utførelsesformer, blir et polypeptid omfattende en ikke-naturlig aminosyre kjemisk modifisert for å generere en reaktiv karbonyl eller dikarbonyl funksjonell gruppe. For eksempel, kan en aldehydfunksjonalitet nyttig for konjugeringsreaksjoner bli generert fra en funksjonalitet som har tilgrensende amino- og hydroksylgrupper. Der det biologisk aktive molekylet er et polypeptid, for eksempel, kan en N-terminal serin eller treonin
- 25 (som normalt kan foreligge eller kan bli eksponert via kjemisk eller enzymatisk digererings) bli brukt for å generere en aldehydfunksjonalitet under milde oksidative spaltingsbetingelser ved anvendelse av perjodat. Se, f.eks. Gaertner, et. al., Bioconjug.

Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner et al., *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994). Fremgangsmåter kjent innen faget er imidlertid begrenset til aminosyren ved N-terminusen av peptidet eller proteinet.

5 I foreliggende oppfinnelse, kan en ikke-naturlig aminosyre som bærer tilgrensende hydroksyl- og aminogrupper bli inkorporert inn i polypeptidet som en "maskert" aldehydfunksjonalitet. For eksempel, bærer 5-hydroksylsyrin en hydroksylgruppe tilgrensende til epsilon-aminet. Reaksjonsbetingelser for å generere aldehydet involverer typisk tilsetning av molart overskudd av natrium metaperjodat under milde betingelser for  
10 å unngå oksidasjon ved andre seter innen polypeptidet. pH-en for oksidasjonsreaksjonen er typisk omkring 7,0. En typisk reaksjon involverer tilsetningen av omkring 1,5 molart overskudd av natrium metaperjodat til en bufret løsning av polypeptidet, fulgt av inkubering i omkring 10 minutter i mørke. Se, f.eks. U.S. patent nr. 6,423,685.

Karbonyl- eller dikarbonylfunksjonaliteten kan bli reagert selektivt med en  
15 hydroksylamin-holdig reagens under milde betingelser i vandig løsning for å danne den tilsvarende oksimbindingen som er stabil under fysiologiske betingelser. Se, f.eks. Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. og Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Dessuten sørger den unike reaktiviteten av karbonyl- eller dikarbonylgruppen for selektiv modifikasjon i nærvær av de andre aminosyresidekjedene.  
20 Se, f.eks. Cornish, V. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., *Science* 276:1125-1128 (1997). *Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroksylamin-Containing Amino Acids*

U.S. provisorisk patentsøknad nr. 60/638,418. Derfor, gjelder redegjørelsene  
25 tilveiebrakt i kapittel V (med tittel "Non-natural Amino Acids"), Part B (med tittel "Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroksylamine-Containing Amino Acids"), i U.S. provisorisk patentsøknad nr. 60/638,418 fullstendig for fremgangsmåtene, sammensetningene (inkludert Formlene I-XXXV), teknikkene og strategiene for tilvirkning, rensing, karakterisering og anvendelse av ikke-naturlige  
30 aminosyrer, ikke-naturlig aminosyre polypeptider og modifiserte ikke-naturlig aminosyre polypeptider beskrevet heri i samme utstrekning som hvis slike redegjørelser var fullstendig presentert heri. U.S. patentpublikasjoner nr. 2006/0194256, 2006/0217532 og 2006/0217289 og WO 2006/069246 med tittel "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides.

35

### KJEMISK SYNTESE AV UNATURLIGE AMINOSYRER

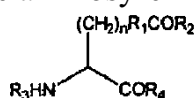
Mange av de unaturlige aminosyrene egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse er kommersielt tilgjengelige, f.eks. fra Sigma (USA) eller Aldrich (Milwaukee, WI, USA). De som ikke er kommersielt tilgjengelige blir eventuelt syntetisert som tilveiebrakt heri

eller som tilveiebrakt i ulike publikasjoner eller ved anvendelse av standardmetoder kjent for fagpersonene. For organiske synteseteknikker, se, f.eks. Organic Chemistry av Fessendon og Fessendon, (1982, andre utgave, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry av Mars (tredje utgave, 1985, Wiley and Sons, New York); og Advanced Organic Chemistry av Carey og Sundberg (tredje utgave, delene A og B, 1990, Plenum Press, New York). Ytterligere publikasjoner som beskriver syntesen av unaturlige aminosyrer inkluderer, f.eks. WO 2002/085923 med tittel "In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids;" Matsoukas et al., (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of  $\gamma$ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J.C. et al. (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 50:1239-1246; Barton et al., (1987) Synthesis of Novel  $\alpha$ -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- $\alpha$ -Amino-Adipic Acids, L- $\alpha$ -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297-4308; and, Subasinghe et al., (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7. *Se også*, U.S. patentpublikasjon nr. US 2004/0198637 med tittel "Protein Arrays".

### A. Karbonyl reaktive grupper

Aminosyrer med en karbonyl reaktiv gruppe sørger for et mangfold av reaksjoner for å knytte molekyler (inkludert men ikke begrenset til, PEG eller andre vannløselige molekyler) sammen via nukleofil addisjon eller aldol kondensasjonsreaksjoner blant andre.

Eksempelvis karbonyl-holdige aminosyrer kan bli representert som følger:



hvor  $n$  er 0-10;  $\text{R}_1$  er en alkyl, aryl, substituert alkyl eller substituert aryl;  $\text{R}_2$  er H, alkyl, aryl, substituert alkyl og substituert aryl; og  $\text{R}_3$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en aminoterminus modifikasjonsgruppe, og  $\text{R}_4$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en

karboksyterminus modifikasjonsgruppe. I noen utførelsesformer er  $n = 1$ ,  $R_1$  er fenyl og  $R_2$  er en enkel alkyl (dvs. metyl, etyl eller propyl) og keton-andelen er posisjonert i *para*-posisjonen i forhold til alkyl-sidekjeden. I noen utførelsesformer er  $n = 1$ ,  $R_1$  er fenyl og  $R_2$  er en enkel alkyl (dvs. metyl, etyl eller propyl) og keton-andelen er posisjonert i *meta*-posisjonen i forhold til alkyl-sidekjeden.

Syntesen av p-acetyl-(+/-)-fenylalanin og m-acetyl-(+/-)-fenylalanin er beskrevet i Zhang, Z., et al., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003). Andre karbonyl-holdige aminosyrer kan på lignende måte bli fremstilt ved én fagperson innen faget.

I noen utførelsesformer, blir et polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre kjemisk modifisert for å generere en reaktiv karbonylfunksjonell gruppe. For eksempel, kan en aldehydfunksjonalitet nyttig for konjugeringsreaksjoner bli generert fra en funksjonalitet som har tilgrensende amino- og hydroksylgrupper. Der det biologisk aktive molekylet er et polypeptid, kan for eksempel, en *N*-terminal serin eller treonin (som normalt kan foreligge eller kan bli eksponert via kjemisk eller enzymatisk digererings) bli brukt for å generere en aldehydfunksjonalitet under milde oksidative spaltingsbetingelser ved anvendelse av perjodat. *Se, f.eks.* Gaertner, et al., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner et al., *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994). Fremgangsmåter kjent innen faget er imidlertid begrenset til aminosyren ved *N*-terminusen av peptidet eller proteinet.

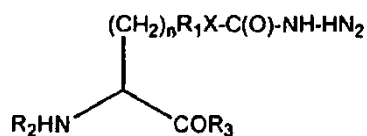
I foreliggende oppfinnelse, kan en ikke-naturlig kodet aminosyre som bærer tilgrensende hydroksyl- og aminogrupper bli inkorporert inn i polypeptidet som en "maskert" aldehydfunksjonalitet. For eksempel, bærer 5-hydroksylisin en hydroksylgruppe tilgrensende til epsilon-aminet. Reaksjonsbetingelser for å generere aldehydet involverer typisk addisjon av molart overskudd av natrium metaperjodat under milde betingelser for å unngå oksidasjon ved andre seter innen polypeptidet. pH-en for oksidasjonsreaksjonen er typisk omkring 7,0. En typisk reaksjon involverer tilsetningen av omkring 1,5 molart overskudd av natrium metaperjodat til en bufret løsning av polypeptidet, fulgt av inkubering i omkring 10 minutter i mørke. *Se, f.eks.* U.S. patent nr. 6,423,685.

Karbonylfunksjonaliteten kan bli reagert selektivt med en hydrazin-, hydrazid-, hydroksylamin- eller semikarbazid-holdig reagens under milde betingelser i vandig løsning for å danne henholdsvis de tilsvarende hydrazon-, oksim- eller semikarbazonbindingene, som er stabile under fysiologiske betingelser. *Se, f.eks.* Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. og Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Dessuten sørger den unike reaktiviteten av karbonylgruppen for selektiv modifikasjon i nærvær av de andre aminosyresidekjedene. *Se, f.eks.* Cornish, V. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., *Science* 276:1125-1128 (1997).

## B. Hydrazin, hydrazid eller semikarbazid reaktive grupper

Ikke-naturlig kodede aminosyrer inneholdende en nukleofil gruppe, så som et hydrazin, hydrazid eller semikarbazid, sørger for reaksjon med et mangfold av elektrofile grupper for å danne konjugater (inkludert men ikke begrenset til, med PEG eller andre vannløselige polymerer).

Eksempelvis hydrazin-, hydrazid- eller semikarbazid-holdige aminosyrer kan bli representert som følger:



hvor  $n$  er 0-10;  $\text{R}_1$  er en alkyl, aryl, substituert alkyl eller substituert aryl eller ikke foreliggende;  $\text{X}$ , er O, N eller S eller ikke foreliggende;  $\text{R}_2$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en aminoterminal modifikasjonsgruppe, og  $\text{R}_3$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en karboksyterminal modifikasjonsgruppe.

I noen utførelsesformer er  $n$  4,  $\text{R}_1$  foreligger ikke, og  $\text{X}$  er N. I noen utførelsesformer er  $n$  2,  $\text{R}_1$  foreligger ikke, og  $\text{X}$  foreligger ikke. I noen utførelsesformer er  $n$  1,  $\text{R}_1$  er fenyl,  $\text{X}$  er O, og oksygenatomet er posisjonert *para* til den alifatiske gruppen på arylringen.

Hydrazid-, hydrazin- og semikarbazid-holdige aminosyrer er tilgjengelige fra kommersielle kilder. For eksempel, er L-glutamat- $\gamma$ -hydrazid tilgjengelig fra Sigma Chemical (St. Louis, MO). Andre aminosyrer som ikke er tilgjengelige kommersielt kan bli fremstilt ved en fagperson *Se, f.eks.* U.S. pat. nr. 6,281,211.

Polypeptider inneholdende ikke-naturlig kodede aminosyrer som bærer hydrazid, hydrazin eller semikarbazid funksjonaliteter kan bli reagert effektivt og selektivt med et mangfold av molekyler som inneholder aldehyder eller andre funksjonelle grupper med lignende kjemisk reaktivitet. *Se, f.eks.* Shao, J. og Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). Den unike reaktiviteten av hydrazid, hydrazin og semikarbazid funksjonelle grupper gjør dem signifikant mer reaktive overfor aldehyder, ketoner og andre elektrofile grupper sammenlignet med de nukleofile gruppene som foreligger på de 20 vanlige aminosyrene (inkludert men ikke begrenset til, hydroksylgruppen av serin eller treonin eller aminogrupper av lysin og N-terminusen).

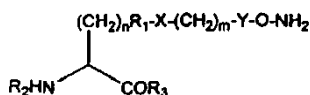
## C. Aminooksy-holdige aminosyrer

Ikke-naturlig kodede aminosyrer inneholdende en aminooksy (også kalt en hydroksylamin) gruppe sørger for reaksjon med et mangfold av elektrofile grupper for å danne konjugater (inkludert men ikke begrenset til, med PEG eller andre vannløselige polymerer). I likhet med hydraziner, hydrazider og semikarbazider, tillater den forsterkede nukleofilisiteten av aminooksygruppen at den reagerer effektivt og selektivt med et mangfold av molekyler som inneholder aldehyder eller andre funksjonelle grupper

med lignende kjemisk reaktivitet. *Se, f.eks.* Shao, J. og Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995); H. Hang og C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34: 727-736 (2001). Mens resultatet av reaksjon med en hydrazingruppe er det tilsvarende hydrazonet, resulterer imidlertid et oksim generelt fra reaksjonen av en aminosygruppe med en

5 karbonyl-holdig gruppe så som et keton.

Eksempelvis aminosyrer inneholdende aminosygrupper kan bli representert som følger:



hvor  $n$  er 0-1,0;  $R_1$  er en alkyl, aryl, substituert alkyl eller substituert aryl eller ikke foreliggende;  $X$  er O, N, S eller ikke foreliggende;  $m$  er 0-10;  $Y = C(O)$  eller ikke foreliggende;  $R_2$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en aminotermus modifikasjons-

10

gruppe, og  $R_3$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en karboksytermus modifikasjons-

gruppe. I noen utførelsesformer er  $n$  1,  $R_1$  er fenyl,  $X$  er O,  $m$  er 1, og  $Y$  foreligger. I noen utførelsesformer er  $n$  2,  $R_1$  og  $X$  foreligger ikke,  $m$  er 0, og  $Y$  foreligger ikke.

15

Aminosy- holdige aminosyrer kan bli fremstilt fra lett tilgjengelige aminosyre- forstadier (homoserin, serin og treonin). *Se, f.eks.* M. Carrasco og R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003). Visse aminosy- holdige aminosyrer, så som L-2-amino-4- (aminosy)smørsyre, har blitt isolert fra naturlige kilder (Rosenthal, G., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997). Andre aminosy- holdige aminosyrer kan bli fremstilt ved en

20

#### D. Azid og alkyn reaktive grupper

Den unike reaktiviteten av azid- og alkynfunksjonelle grupper gjør dem ekstremt nyttige for den selektive modifikasjonen av polypeptider og andre biologiske molekyler.

25

Organiske azider, spesielt alifatiske azider og alkynner er generelt stabile overfor vanlige reaktive kjemiske betingelser. Spesielt er både de azid- og de alkynfunksjonelle gruppene inerte overfor sidekjedene (dvs. R-grupper) av de 20 vanlige aminosyrene funnet i naturlig-forekommende polypeptider. Når brakt i tett nærhet, blir imidlertid den "fjær- belastede" naturen av azid- og alkyngruppene avslørt og de reagerer selektivt og effektivt

30

via Huisgen [3+2] sykloaddisjonsreaksjon for å generere det tilsvarende triazolet. *Se, f.eks.* Chin J., et al., Science 301:964-7 (2003); Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002).

Fordi Huisgen sykloaddisjonsreaksjonen involverer en selektiv sykloaddisjons- reaksjon (*se, f.eks.* Padwa, A., i COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS, bind. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), s. 1069-1109; Huisgen, R. i 1,3-DIPOLAR SYKLOADDITION CHEMISTRY, (red. Padwa, A., 1984), s. 1-176) snarere enn en nukleofil substitusjon,

35

tillater inkorporeringen av ikke-naturlig kodede aminosyrer som bærer azid- og alkyn-

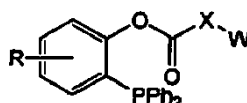


holdige sidekjeder at de resulterende polypeptidene blir modifisert selektivt ved posisjonen av den ikke-naturlig kodede aminosyren. Sykloaddisjonsreaksjon som involverer azid- eller alkyn-holdig FGF-21 polypeptid kan bli utført ved romtemperatur under vandige betingelser ved tilsetningen av Cu(II) (inkludert men ikke begrenset til, i form av en katalytisk mengde av CuSO<sub>4</sub>) i nærvær av et reduksjonsmiddel for å redusere Cu(II) til Cu(I), in situ, i katalytisk mengde. *Se, f.eks.* Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornøe, C. W., et al., J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002). Eksempelvis inkluderer, inkludert men ikke begrenset til, askorbat, metallisk kobber, kinin, hydrokinon, vitamin K, glutation, cystein, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, og et utøvet elektrisk potensiale.

I noen tilfeller, hvor en Huisgen [3+2] sykloaddisjonsreaksjon mellom et azid og et alkyn er ønsket, omfatter FGF-21 polypeptidet en ikke-naturlig kodet aminosyre omfattende en alkyn-andel og den vannløselige polymeren som skal bli festet til aminosyren omfatter en azid-andel. Alternativt kan den omvendte reaksjonen (dvs. med azid-andelen på aminosyren og alkynandelen foreliggende på den vannløselige polymeren) også bli utført.

Den azidfunksjonelle gruppen kan også bli reagert selektivt med en vannløselig polymer inneholdende en arylerster og passende funksjonalisert med en arylfosfin-andel for å generere en amidbinding. Arylfosfingruppen reduserer azidet in situ og det resulterende aminet reagerer så effektivt med en proksimal esterbinding for å generere det tilsvarende amidet. *Se, f.eks.* E. Saxon og C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000). Den azid-holdige aminosyren kan være enten et alkylazid (inkludert men ikke begrenset til, 2-amino-6-azido-1-heksansyre) eller et arylazid (p-azido-fenylalanin).

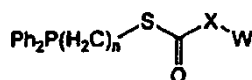
Eksempelvis vannløselige polymerer inneholdende en arylerster og en fosfin-andel kan bli representert som følger:



hvor X kan være O, N, S eller ikke foreliggende, Ph er fenyl, W er en vannløselig polymer og R kan være H, alkyl, aryl, substituert alkyl og substituerte arylgrupper. Eksempelvis R-grupper inkluderer men er ikke begrenset til -CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OR', -NR'R'', -SR', -halogen, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -CN og -NO<sub>2</sub>. R', R'', R''' og R'''' angir hver uavhengig hydrogen, substituert eller usubstituert heteroalkyl, substituert eller usubstituert aryl, inkludert men ikke begrenset til, aryl substituert med 1-3 halogener, substituert eller usubstituert alkyl, alkoksy eller tioalkoksy grupper, eller arylalkylgrupper. Når en forbindelse ifølge oppfinnelsen inkluderer mer enn én R-gruppe, for eksempel, er hver av R-gruppene uavhengig valgt som hver er R', R'', R''' og R'''' grupper når mer enn én av disse gruppene foreligger. Når R' og R'' er festet til det samme nitrogenatomet, kan de bli kombinert med nitrogenatomet for å danne en 5-, 6-, eller 7-

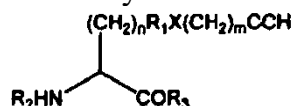
leddet ring. For eksempel er -NR'R" ment å inkludere, men ikke være begrenset til, 1-pyrrolidinyl og 4-morfolinyl. Fra diskusjonen av substituenten over, vil en fagperson forstå at begrepet "alkyl" er ment å inkludere grupper som inkluderer karbonatomer bundet til grupper andre enn hydrogenatomer, så som haloalkyl (inkludert men ikke begrenset til, -CF<sub>3</sub> og -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) og acyl (inkludert men ikke begrenset til, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, og lignende).

Den azidfunksjonelle gruppen kan også bli reagert selektivt med en vannløselig polymer inneholdende en tioester og passende funksjonalisert med en arylfosfin-andel for å generere en amidbinding. Arylfosfingruppen reduserer azidet in situ og det resulterende aminet reagerer så effektivt med tioesterbindingen for å generere det tilsvarende amidet. Eksempelvis vannløselige polymerer inneholdende en tioester og en fosfin-andel kan bli representert som følger:



hvor n er 1-10; X kan være O, N, S eller ikke foreliggende, Ph er fenyl og W er en vannløselig polymer.

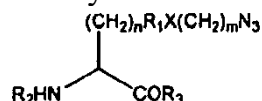
Eksempelvis alkynholdige aminosyrer kan bli representert som følger:



hvor n er 0-10; R<sub>1</sub> er en alkyl, aryl, substituert alkyl eller substituert aryl eller ikke foreliggende; X er O, N, S eller ikke foreliggende; m er 0-10, R<sub>2</sub> er H, en aminosyre, et polypeptid eller en aminoterminal modifikasjonsgruppe, og R<sub>3</sub> er H, en aminosyre, et polypeptid eller en karboksyterminus modifikasjonsgruppe. I noen utførelsesformer er n 1, R<sub>1</sub> er fenyl, X foreligger ikke, m er 0 og acetylenandelen er posisjonert i para-posisjonen i forhold til alkyl-sidekjeden. I noen utførelsesformer er n 1, R<sub>1</sub> er fenyl, X er O, m er 1 og propargyloksygruppen er posisjonert i para-posisjonen i forhold til alkylsidekjeden (dvs. O-propargyl-tyrosin). I noen utførelsesformer er n 1, R<sub>1</sub> og X foreligger ikke og m er 0 (dvs. propargylglysin).

Alkynholdige aminosyrer er kommersielt tilgjengelige. For eksempel, er propargylglysin kommersielt tilgjengelig fra Peptech (Burlington, MA). Alternativt, kan alkynholdige aminosyrer bli fremstilt ifølge standardmetoder. For eksempel, kan *p*-propargyloksyfenylalanin bli syntetisert, for eksempel, som beskrevet i Deiters, A., et al., J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003), og 4-alkynyl-L-fenylalanin kan bli syntetisert som beskrevet i Kayser, B., et al., Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997). Andre alkynholdige aminosyrer kan bli fremstilt ved en fagperson innen faget.

Eksempelvis azidholdige aminosyrer kan bli representert som følger:



hvor  $n$  er 0-10;  $R_1$  er en alkyl, aryl, substituert alkyl, substituert aryl eller ikke foreliggende;  $X$  er O, N, S eller ikke foreliggende;  $m$  er 0-10;  $R_2$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en aminoterminal modifikasjonsgruppe, og  $R_3$  er H, en aminosyre, et polypeptid eller en karboksyterminale modifikasjonsgruppe. I noen utførelsesformer er  $n$  1,  $R_1$  er fenyl,  $X$  foreligger ikke,  $m$  er 0 og azid-andelen er posisjonert *para* til alkyl-sidekjeden. I noen utførelsesformer er  $n$  0-4 og  $R_1$  og  $X$  foreligger ikke, og  $m=0$ . I noen utførelsesformer er  $n$  1,  $R_1$  er fenyl,  $X$  er O,  $m$  er 2 og  $\beta$ -azidoetoksy-andelen er posisjonert i *para*-posisjonen i forhold til alkyl-sidekjeden.

Azid-holdige aminosyrer er tilgjengelige fra kommersielle kilder. For eksempel, kan 4-azidofenylalanin bli oppnådd fra Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL). For de azid-holdige aminosyrene som ikke er kommersielt tilgjengelige, kan azidgruppen bli fremstilt relativt lett ved anvendelse av standardmetoder kjent for fagpersonene, inkludert men ikke begrenset til, via forskyvning av en egnet forlatende gruppe (inkludert men ikke begrenset til, halogenid, mesylat, tosylat) eller via åpning av et passende beskyttet lakton. *Se, f.eks.* Advanced Organic Chemistry av Mars (tredje utgave, 1985, Wiley and Sons, New York).

### E. Aminotiol reaktive grupper

Den unike reaktiviteten av beta-substituerte aminotioolfunksjonelle grupper gjør dem ekstremt nyttige for den selektive modifikasjonen av polypeptider og andre biologiske molekyler som inneholder aldehydgrupper via dannelsen av tiazolidinet. *Se, f.eks.* J. Shao og J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899. I noen utførelsesformer, kan beta-substituerte aminotiol-aminosyrer bli inkorporert inn i FGF-21 polypeptider og så reagert med vannløselige polymerer omfattende en aldehyd-funksjonalitet. I noen utførelsesformer, kan en vannløselig polymer, legemiddelkonjugat eller annen nyttelast bli koplet til et FGF-21 polypeptid omfattende en beta-substituert aminotiol-aminosyre via dannelsen av tiazolidinet.

### F. Ytterligere reaktive grupper

Ytterligere reaktive grupper og ikke-naturlig kodede aminosyrer som kan bli inkorporert i FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen er beskrevet i de følgende patentsøknader: U.S. patentpublikasjon nr. 2006/0194256, U.S. patentpublikasjon nr. 2006/0217532, U.S. patentpublikasjon nr. 2006/0217289, U.S. provisorisk patent nr. 60/755,338; U.S. provisorisk patent nr. 60/755,711; U.S. provisorisk patent nr. 60/755,018; Internasjonal patentsøknad nr. PCT/US06/49397; WO 2006/069246; U.S. provisorisk patent nr. 60/743,041; U.S. provisorisk patent nr. 60/743,040; Internasjonal patentsøknad nr. PCT/US06/47822; U.S. provisorisk patent nr. 60/882,819; U.S. provisorisk patent nr. 60/882,500; og U.S. provisorisk patent nr. 60/870,594.

## CELLULÆRT OPPTAK AV UNATURLIGE AMINOSYRER

Unaturlig aminosyreopptak ved en celle er ett tema som typisk blir vurdert når en designer og velger unaturlige aminosyrer, inkludert men ikke begrenset til, for  
5 inkorporering i et protein. For eksempel, foreslår den høye ladningstettheten av  $\alpha$ -aminosyrer at det er usannsynlig at disse forbindelsene er cellepermeable. Naturlige aminosyrer blir tatt opp i den eukaryotiske cellen via en samling av protein-baserte transportsystemer. En hurtig grovsortering kan bli gjort som vurderer hvilke unaturlige aminosyrer, hvis noen, som blir tatt opp av celler. *Se, f.eks.* toksisitetsundersøkelsene i,  
10 f.eks. U.S. patentpublikasjon nr. US 2004/0198637 med tittel "Protein Arrays" ; og Liu, D.R. & Schultz, P.G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an ekspandert genetic code. PNAS United States 96:4780-4785. Selv om opptak enkelt blir analysert med ulike undersøkelser, er et alternativ til å designe unaturlige aminosyrer som kan forbedres for cellulære opptaksveier, å tilveiebringe biosyntetiske veier for å danne  
15 aminosyrer in vivo.

## BIOSYNTETISE AV UNATURLIGE AMINOSYRER

Mange biosyntetiske veier eksisterer allerede i celler for produksjonen av aminosyrer og andre forbindelser. Selv om en biosyntetisk metode for en spesiell  
20 unaturlig aminosyre ikke nødvendigvis eksisterer i natur, inkludert men ikke begrenset til, i en celle, tilveiebringer redegjørelsen slike metoder. For eksempel, blir biosyntetiske veier for unaturlige aminosyrer eventuelt generert i vertscelle ved tilsetning av nye enzymer eller modifisering av eksisterende vertscelleveier. Ytterligere nye enzymer er eventuelt naturlig forekommende enzymer eller kunstig utviklede enzymer. For eksempel,  
25 er biosyntesen av p-aminofenylalanin (som presentert i et eksempel i WO 2002/085923 med tittel "In vivo incorporation of unnatural amino acids") henvist til tilsetningen av en kombinasjon av kjente enzymer fra andre organismer. Genene for disse enzymene kan bli introdusert i en eukaryotisk celle ved å transformere cellen med et plasmid omfattende genene. Genene, når uttrykt i cellen, tilveiebringer en enzymatisk vei for å syntetisere den  
30 ønskede forbindelsen. Eksempler på typene enzymer som eventuelt blir tilsatt er tilveiebrakt i eksemplene under. Ytterligere enzymsekvenser blir funnet, for eksempel, i Genbank. Kunstig utviklede enzymer blir også eventuelt tilført inn i en celle på den samme måten. På denne måten, blir det cellulære maskineriet og ressursene for en celle manipulert for å tilvirke unaturlige aminosyrer.

35 Et mangfold av fremgangsmåter er tilgjengelige for fremstilling av nye enzymer for bruk i biosyntetiske veier eller for utvikling av eksisterende veier. For eksempel blir, rekursiv rekombinering, inkludert men ikke begrenset til, som utviklet ved Maxygen, Inc. (tilgjengelig på verdensveven på maxygen.com), eventuelt brukt for å utvikle nye

enzymer og veier. *Se, f.eks.* Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370(4):389-391; og, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751 Likeledes blir DesignPath™, utviklet ved Genencor (tilgjengelig på verdensveven på genencor.com) eventuelt brukt for konstruksjon av en metabolsk vei, inkludert men ikke begrenset til, for å konstruere en vei for å danne O-metyl-L-tyrosin i en celle. Denne teknologien rekonstruerer eksisterende veier i vertsorganismer ved anvendelse av en kombinasjon av nye gener, inkludert men ikke begrenset til, de identifisert ved funksjonell genomikk, og molekylær utvikling og design. Diversa Corporation (tilgjengelig på verdensveven på diversa.com) tilveiebringer også teknologi for hurtig screening av biblioteker av gener og genveier, inkludert men ikke begrenset til, for å danne nye veier.

Typisk blir den unaturlige aminosyren produsert med en konstruert biosyntetisk vei ifølge oppfinnelsen produsert i en konsentrasjon tilstrekkelig for effektiv proteinbiosyntese, inkludert men ikke begrenset til, en naturlig cellulær mengde, men ikke i en slik grad at det påvirker konsentrasjonen av de andre aminosyrene eller forbruker cellulære ressurser. Typiske konsentrasjoner produsert in vivo på denne måten er omkring 10 mM til omkring 0,05 mM. Med én gang en celle er transformert med et plasmid omfattende genene brukt for å tilvirke enzymer ønsket for en spesifikk vei og en unaturlig aminosyre er generert, blir in vivo seleksjoner eventuelt brukt for å ytterligere optimalisere produksjonen av den unaturlige aminosyren for både ribosomal proteinsyntese og cellevekst.

### POLYPEPTIDER MED UNATURLIGE AMINOSYRER

Inkorporeringen av en unaturlig aminosyre kan bli gjort for et mangfold av formål, inkludert men ikke begrenset til, skreddersy forandringer i proteinstruktur og/eller funksjon, forandre størrelse, surhet, nukleofilisitet, hydrogenbinding, hydrofobisitet, tilgjengelighet av proteasemålseter, målsøkning til en andel (inkludert men ikke begrenset til, for en proteingruppering), addisjon av et biologisk aktivt molekyl, festing av en polymer, festing av et radionuklid, modulering av serum-halveringstid, modulering av vevspenetrering (f.eks. tumorer), modulering av aktiv transport, modulering av vevs-, celle- eller organspesifisitet eller fordeling, modulering av immunogenisitet, modulering av proteaseresistens, etc. Proteiner som inkluderer en unaturlig aminosyre kan ha forsterket eller til og med fullstendig nye katalytiske eller biofysiske egenskaper. For eksempel, blir de følgende egenskapene eventuelt modifisert ved inkludering av en unaturlig aminosyre i et protein: toksisitet, biologisk fordeling, strukturelle egenskaper, spektroskopiske egenskaper, kjemiske og/eller fotokjemiske egenskaper, katalytisk evne, halveringstid (inkludert men ikke begrenset til, serum-halveringstid), evne til å reagere med andre molekyler, inkludert men ikke begrenset til, kovalent eller ikke-kovalent og

lignende. Sammensetningene som inkluderer proteiner som inkluderer minst én unaturlig aminosyre er nyttige for, inkludert men ikke begrenset til, nye terapeutika, diagnostika, katalytiske enzymer, industrielle enzymer, bindingsproteiner (inkludert men ikke begrenset til, antistoffer), og inkludert men ikke begrenset til, studien av proteinstruktur og funksjon. *Se, f.eks.* Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652.

I ett aspekt av oppfinnelsen, inkluderer en sammensetning minst ett protein med én unaturlig aminosyre.

Interessante proteiner eller polypeptider med én unaturlig aminosyre er et kjennetegn ved oppfinnelsen. Oppfinnelsen inkluderer også polypeptider eller proteiner med én unaturlig aminosyre produsert ved anvendelse av sammensetningene og fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. En eksipiens (inkludert men ikke begrenset til, en farmasøytisk akseptabel eksipiens) kan også foreligge med proteinet.

Ved tilvirkning av interessante proteiner eller polypeptider med én unaturlig aminosyre i eukaryotiske celler, vil proteiner eller polypeptider typisk inkludere eukaryotiske post-translasjonelle modifikasjoner. I visse utførelsesformer, inkluderer et protein én unaturlig aminosyre og minst én post-translasjonell modifikasjon som blir gjort in vivo ved en eukaryotisk celle, hvor den post-translasjonelle modifikasjonen ikke blir gjort ved en prokaryotisk celle. For eksempel inkluderer post-translasjon modifikasjonen, inkludert men ikke begrenset til, acetylering, acylering, lipid-modifikasjon, palmitoylering, palmitataddisjon, fosforylering, glykolipid-bindingsmodifikasjon, glykosylering og lignende. I ett aspekt inkluderer den post-translasjonelle modifikasjonen tilknytning av et oligosakkarid (inkludert men ikke begrenset til, (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc)) til et asparagin ved en GlcNAc-asparaginbinding. Se Tabell 1 som lister noen eksempler på N-tilknyttede oligosakkarider av eukaryotiske proteiner (ytterligere rester kan også foreligge, som ikke er vist). I et annet aspekt, inkluderer den post-translasjonelle modifikasjonen tilknytning av et oligosakkarid (inkludert men ikke begrenset til, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) til et serin eller treonin ved en GalNAc-serin eller GalNAc-treoninbinding, eller et GlcNAc-serin eller en GlcNAc-treoninbinding.

TABELL 1: EKSEMPLER PÅ OLIGOSAKKARIDER VED GlcNAc-BINDING

Type	Basisstruktur
Høy-mannose	$  \begin{array}{c}  \text{Man}\alpha\text{1-6} \\  \text{Man}\alpha\text{1-3} \quad \diagup \quad \diagdown \\  \text{Man}\alpha\text{1-6} \\  \text{Man}\alpha\text{1-3} \quad \diagup \quad \diagdown \\  \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn}  \end{array}  $
Hybrid	$  \begin{array}{c}  \text{Man}\alpha\text{1-6} \\  \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \text{ --- } \text{Man}\alpha\text{1-3} \quad \diagup \quad \diagdown \\  \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn}  \end{array}  $

Kompleks	$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \text{ --- } \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \text{ --- } \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn}$
Xylose	$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Xyl}\beta\text{1-2} \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn}$

I enda et annet aspekt, inkluderer post-translasjon modifikasjonen proteolytisk prosessering av forstadier (inkludert men ikke begrenset til, kalsitoninforstadium, kalsitonin gen-beslektet peptid-forstadium, preproparatyroid hormon, preproinsulin, proinsulin, prepro-opiomelanokortin, pro-opiomelanokortin og lignende), sammenstilling i et multi-underenhet protein eller makromolekylær sammenstilling, translasjon til et annet sete i cellen (inkludert men ikke begrenset til, til organeller, så som det endoplasmiske retikulum, Golgiapparatet, kjernen, lysosomer, peroksisomer, mitokondrier, kloroplaster, vakuoler, etc., eller gjennom den sekretoriske veien). I visse utførelsesformer, omfatter proteinet en sekresjons- eller lokaliseringsekvens, en epitop-tag, en FLAG-tag, en polyhistidin-tag, en GST fusjon, eller lignende.

Én fordel ved en unaturlig aminosyre er at den presenterer ytterligere kjemiske andeler som kan bli brukt for å legge til ytterligere molekyler. Disse modifikasjonene kan bli gjort *in vivo* i en eukaryotisk eller ikke-eukaryotisk celle, eller *in vitro*. Derfor er, i visse utførelsesformer, den post-translasjonelle modifikasjonen ved den unaturlige aminosyren. For eksempel, kan den post-translasjonelle modifikasjonen være ved en nukleofil-elektrofil reaksjon. De fleste reaksjoner som for tiden blir brukt for den selektive modifikasjonen av proteiner involverer kovalent bindingsdannelse mellom nukleofile og elektrofile reaksjonspartnere, inkludert men ikke begrenset til reaksjonen av  $\alpha$ -haloketoner med histidin- eller cysteinsidekjeder. Selektivitet er i disse tilfellene bestemt ved antallet og tilgjengeligheten av de nukleofile restene i proteinet. I proteiner ifølge oppfinnelsen, kan andre mer selektive reaksjoner bli brukt så som reaksjonen av en unaturlig ketoaminosyre med hydrazider eller aminooksyforbindelser, *in vitro* og *in vivo*. *Se, f.eks.* Cornish, et al., (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, 118:8150-8151; Mahal, et al., (1997) *Science* 276:1125-1128; Wang, et al., (2001) *Science* 292:498-500; Chin, et al., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027; Chin, et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:11020-11024; Wang, et al., (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:56-61; Zhang, et al., (2003) *Biochemistry*, 42:6735-6746; og, Chin, et al., (2003) *Science*, 301:964-7. Dette tillater den selektive merkingen av praktisk talt et hvilket som helst protein med en mengde reagenser inkludert fluoroforer, kryssbindende midler, sakkaridderivater og cytotoxiske molekyler. *Se også*, U.S. patent nr. 6,927,042 med tittel "Glycoprotein synthesis". Post-translasjonelle modifikasjoner, inkludert men ikke begrenset til, ved en azido-aminosyre, kan også bli gjort ved Staudinger-ligasjonen (inkludert men ikke begrenset til, med triarylfosfinreagenser). *Se, f.eks.* Kiick et al., (2002) *Incorporation of azides into*

recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24.

Denne redegjørelsen tilveiebringer en annen svært effektiv fremgangsmåte for den selektive modifikasjonen av proteiner, som involverer den genetiske inkorporeringen av unaturlige aminosyrer, inkludert men ikke begrenset til, inneholdende en azid- eller alkynylandel til proteiner som svar på et selektorkodon. Disse aminosyresidekjedene kan så bli modifisert ved, inkludert men ikke begrenset til, en Huisgen [3+2] sykloaddisjonsreaksjon (*se, f.eks.* Padwa, A. i *Comprehensive Organic Synthesis*, bind 4. (1991) red. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, s. 1069-1109; og, Huisgen, R. i *1,3-Dipolar Sykloaddition Chemistry*, (1984) red. Padwa, A., Wiley, New York, s. 1-176) med, inkludert men ikke begrenset til, henholdsvis alkynyl- eller azidderivater. Fordi denne fremgangsmåten involverer en sykloaddisjon snarere enn en nukleofil substitusjon, kan proteiner bli modifisert med ekstremt høy selektivitet. Denne reaksjonen kan bli utført ved romtemperatur i vandige betingelser med utmerket regioselektivitet (1,4 > 1,5) ved tilsetningen av katalytiske mengder av Cu(I) salter til reaksjonsblandingen. *Se, f.eks.* Tornøe, et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3464; og, Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599. En annen fremgangsmåte som kan bli brukt er ligandutskiftningen på en bisarsen-forbindelse med et tetracysteinmotiv, *se, f.eks.* Griffin, et al., (1998) *Science* 281:269-272.

Et molekyl som kan bli addert til et protein ifølge oppfinnelsen ved en [3+2] sykloaddisjon inkluderer praktisk talt et hvilket som helst molekyl med et azid- eller alkynylderivat. Molekyler inkluderer, men er ikke begrenset til, fargestoffer, fluoroforer, kryssbindende midler, sakkaridderivater, polymerer (inkludert men ikke begrenset til, derivater av polyetylenglykol), fotokryssbindere, cytotoxiske forbindelser, affinitetsmerker, derivater av biotin, harpikser, kuler, et andre protein eller polypeptid (eller flere), polynukleotid(er) (inkludert men ikke begrenset til, DNA, RNA, etc.), metall-kompleksdannere, kofaktorer, fettsyrer, karbohydrater og lignende. Disse molekylene kan bli addert til henholdsvis en unaturlig aminosyre med en alkynylgruppe, inkludert men ikke begrenset til, p-propargyloksyfenylalanin, eller azidogruppe, inkludert men ikke begrenset til, p-azido-fenylalanin.

#### ***V. In vivo generering av FGF-21 polypeptider omfattende ikke-naturlig-kodede aminosyrer***

FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan bli generert in vivo ved anvendelse av modifiserte tRNA og tRNA syntetaser for å legge til eller substituere aminosyrer som ikke blir kodet for i naturlig-forekommende systemer.

Fremgangsmåter for å generere tRNAer og tRNA syntetaser som bruker aminosyrer som ikke blir kodet for i naturlig-forekommende systemer er beskrevet i, f.eks. U.S. patenter nr. 7,045,337 og 7,083,970. Disse fremgangsmåtene involverer å



generere et translasjonelt maskineri som fungerer uavhengig av syntetasene og tRNAene endogent til translasjonssystemet (og derfor noen ganger blir referert til som "ortogonal"). Typisk omfatter translasjonssystemet en ortogonal tRNA (O-tRNA) og en ortogonal aminoacyl tRNA syntetase (O-RS). Typisk aminoacylerer O-RSen fortrinnsvis O-tRNAet med minst én ikke-naturlig forekommende aminosyre i translasjonssystemet og O-tRNAet gjenkjenner minst ett selektorkodon som ikke er gjenkjent ved andre tRNAer i systemet. Translasjonssystemet setter derfor inn den ikke-naturlig-kodede aminosyren i et protein produsert i systemet, som svar på et kodet selektorkodon, "substituerer" derved en aminosyre i en posisjon i det kodede polypeptidet.

Et vidt mangfold av ortogonale tRNAer og aminoacyl tRNA syntetaser har blitt beskrevet innen faget for å sette inn spesielle syntetiske aminosyrer i polypeptider, og er generelt egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse. For eksempel, er keto-spesifikke O-tRNA/aminoacyl-tRNA syntetaser beskrevet i Wang, L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:56-61 (2003) og Zhang, Z. et al., Biochem. 42(22):6735-6746 (2003).

Eksempelvis O-RS, eller andeler derav, blir kodet for ved polynukleotidsekvenser og inkluderer aminosyresekvenser vist i U.S. patenter nr. 7,045,337 og 7,083,970. Tilsvarende O-tRNA molekyler for bruk med O-RSene er også beskrevet i U.S. patenter nr. 7,045,337 og 7,083,970. Ytterligere eksempler på O-tRNA/aminoacyl-tRNA syntetase-par er beskrevet i WO 2005/007870, WO 2005/007624; og WO 2005/019415.

Et eksempel på et azid-spesifikt O-tRNA/aminoacyl-tRNA syntetasesystem er beskrevet i Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002). Eksempelvis O-RS sekvenser for *p*-azido-L-Phe inkluderer, men er ikke begrenset til, nukleotidsekvenser SEKV IDer NR: 14-16 og 29-32 og aminosyresekvenser SEKV IDer NR: 46-48 og 61-64 som vist i U.S. patent nr. 7,083,970. Eksempelvis O-tRNA sekvenser egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse inkluderer, men er ikke begrenset til, nukleotidsekvenser SEKV IDer NR: 1-3 som vist i U.S. patent nr. 7,083,970). Andre eksempler på O-tRNA/aminoacyl-tRNA syntetasepar spesifikke for spesielle ikke-naturlig kodede aminosyrer er beskrevet i U.S. patent nr. 7,045,337. O-RS og O-tRNA som inkorporerer både keto- og azid-holdige aminosyrer i *S. cerevisiae* er beskrevet i Chin, J. W., et al., Science 301:964-967 (2003).

Mange andre ortogonale par har blitt rapportert. Glutaminyl (*se, f.eks.* Liu, D. R., og Schultz, P. G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4780-4785), aspartyl (*se, f.eks.* Pastrnak, M., et al., (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286), og tyrosyl (*se, f.eks.* Ohno, S., et al., (1998) J. Biochem. (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068; og Kowal, A. K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273) systemer avledet fra *S. cerevisiae* tRNAer og syntetaser har blitt beskrevet for den potensielle inkorporeringen av unaturlige aminosyrer i *E. coli*. Systemer avledet fra *E. coli* glutaminyl (*se, f.eks.* Kowal, A. K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273) og tyrosyl (*se, f.eks.* Edwards, H., og Schimmel, P. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641) syntetasene har blitt beskrevet

for bruk i *S. cerevisiae*. *E. coli* tyrosyl-systemet har blitt brukt for inkorporeringen av 3-jod-L-tyrosin in vivo, i mammalske celler. Se, Sakamoto, K., et al., (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:4692-4699.

5 Bruk av O-tRNA/aminoacyl-tRNA syntetaser involverer seleksjon av et spesifikt kodon som koder for den ikke-naturlig kodede aminosyren. Selv om et hvilket som helst kodon kan bli brukt, er det generelt ønskelig å velge et kodon som sjelden eller aldri blir brukt i cellen som O-tRNA/aminoacyl-tRNA syntetasen er uttrykt i. For eksempel, inkluderer eksempelvis kodoner nonsense-kodon så som stoppkodoner (amber, ochre, og opal), fire eller flere base-kodoner og andre naturlig tre-base-kodoner som er sjeldne eller  
10 ubrukt.

Spesifikk(e) selektorkodon(er) kan bli introdusert til passende posisjoner i den FGF-21 polynukleotid-kodende sekvensen ved anvendelse av mutagenesemetoder kjent innen faget (inkludert men ikke begrenset til, sete-spesifikk mutagenese, kassett-mutagenese, restriksjonsseleksjonsmutagenese, etc.).

15 Fremgangsmåter for å generere komponenter av det protein-biosyntetiske maskineriet, så som O-RSer, O-tRNAer og ortogonale O-tRNA/O-RS par som kan bli brukt for å inkorporere en ikke-naturlig kodet aminosyre er beskrevet i Wang, L., et al., *Science* 292: 498-500 (2001); Chin, J. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z. et al., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003). Fremgangsmåter og  
20 sammensetninger for in vivo inkorporeringen av ikke-naturlig kodede aminosyrer er beskrevet i U.S. patent nr. 7,045,337. Fremgangsmåter for å velge et ortogonalt tRNA-tRNA syntetasepar for bruk i in vivo translasjonssystem av en organisme er også beskrevet i U.S. patenter nr. 7,045,337 og 7,083,970. PCT publikasjon nr. WO 04/035743 med tittel "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins," beskriver  
25 ortogonale RS og tRNA-par for inkorporeringen av keto-aminosyrer. PCT publikasjon nr. WO 04/094593 med tittel "Expanding the Eucaryotic Genetic Code," beskriver ortogonale RS og tRNA par for inkorporeringen av ikke-naturlig kodede aminosyrer i eukaryotiske vertsceller.

Fremgangsmåter for å fremstille minst én rekombinant ortogonal aminoacyl-tRNA  
30 syntetase (O-RS) omfatter: (a) generering av et bibliotek av (eventuelt mutante) RSer avledet fra minst én aminoacyl-tRNA syntetase (RS) fra en første organisme, inkludert men ikke begrenset til, en prokaryotisk organisme, så som *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, eller lignende, eller en eukaryotisk  
35 organisme; (b) valg (og/eller screening) av biblioteket av RSer (eventuelt mutante RSer) for elementer som aminoacylerer et ortogonalt tRNA (O-tRNA) i nærvær av en ikke-naturlig kodet aminosyre og en naturlig aminosyre, og derved tilveiebringe en pool av aktive (eventuelt mutante) RSer; og/eller, (c) velge (eventuelt ved negativ seleksjon) poolen for aktive RSer (inkludert men ikke begrenset til, mutante RSer) som fortrinnsvis

aminoacylerer O-tRNAet i fraværet av den ikke-naturlig kodede aminosyren, og derved tilveiebringer den minst ene rekombinante O-RSen; hvori den minst ene rekombinante O-RSen fortrinnsvis aminoacylerer O-tRNAet med den ikke-naturlig kodede aminosyren.

I én utførelsesform, er RSen en inaktiv RS. Den inaktive RSen kan bli generert ved å mutere en aktiv RS. For eksempel, kan den inaktive RSen bli generert ved å mutere minst omkring 1, minst omkring 2, minst omkring 3, minst omkring 4, minst omkring 5, minst omkring 6, eller minst omkring 10 eller flere aminosyrer til forskjellige aminosyrer, inkludert men ikke begrenset til, alanin.

Biblioteker av mutante RSer kan bli generert ved anvendelse av ulike teknikker kjent innen faget, inkludert men ikke begrenset til rasjonell design basert på protein tredimensjonal RS struktur, eller mutagenese av RS nukleotider i en tilfeldig eller rasjonell designteknikk. For eksempel kan de mutante RSene bli generert ved sete-spesifikke mutasjoner, tilfeldige mutasjoner, diversitetsgenererende rekombinasjonsmutasjoner, kimære konstrukter, rasjonell design og ved andre fremgangsmåter beskrevet heri eller kjent innen faget.

I én utførelsesform av redegjørelsen, vil valg (og/eller screening) av biblioteket av RSer (eventuelt mutante RSer) for elementer som er aktive, inkludert men ikke begrenset til, som aminoacylerer en ortogonal tRNA (O-tRNA) i nærvær av en ikke-naturlig kodet aminosyre og en naturlig aminosyre inkludere: å introdusere en positiv seleksjons- eller screeningmarkør, inkludert men ikke begrenset til, et antibiotikaresistensgen, eller lignende, og biblioteket av (eventuelt mutante) RSer inn i mange celler, hvori den positive seleksjons- og/eller screeningmarkøren omfatter minst ett selektorkodon, inkludert men ikke begrenset til, et amber, ochre eller opalkodon; dyrke de mange cellene i nærvær av et seleksjonsmiddel; identifisere celler som overlever (eller viser en spesifikk respons) i nærvær av seleksjons- og/eller screeningmidlet ved å undertrykke det minst ene selektorkodonet i den positive seleksjons- eller screeningmarkøren, og derved tilveiebringe et undersett av positivt valgte celler som inneholder poolen av aktive (eventuelt mutante) RSer. Eventuelt kan seleksjons- og/eller screeningmiddelkonsentrasjonen bli variert.

I ett aspekt av redegjørelsen, er den positive seleksjonsmarkøren et kloramfenikol acetyltransferase (CAT) gen og selektorkodonet er et amber stoppkodon i CAT genet. Eventuelt er den positive seleksjonsmarkøren et  $\beta$ -laktamase-gen og selektorkodonet er et amber stoppkodon i  $\beta$ -laktamase-genet. I et annet aspekt av redegjørelsen omfatter den positive screeningmarkøren en fluorescent eller luminescent screeningmarkør eller en affinitetsbasert screeningmarkør (inkludert men ikke begrenset til, en celleoverflate-markør).

I én utførelsesform av redegjørelsen, vil negativt valg eller screening av poolen for aktive RSer (eventuelt mutanter) som fortrinnsvis aminoacylerer O-tRNAet i fraværet av den ikke-naturlig kodede aminosyren inkludere: å introdusere en negativ seleksjons- eller screeningmarkør med poolen av aktive (eventuelt mutante) RSer fra den positive

seleksjonen eller screeningen til mange celler av en andre organisme, hvori den negative seleksjons- eller screeningmarkøren omfatter minst ett selektorkodon (inkludert men ikke begrenset til, et antibiotikaresistensgen, inkludert men ikke begrenset til, et kloramfenikol acetyltransferase (CAT) gen); og, identifisere celler som overlever eller viser en spesifikk screeningrespons i et første medium supplementert med den ikke-naturlig kodede aminosyren og et screening- eller seleksjonsmiddel, men mislykkes i å overleve eller å vise den spesifikke responsen i et andre medium ikke supplementert med den ikke-naturlig kodede aminosyren og seleksjons- eller screeningmidlet, og derved tilveiebringer overlevende celler eller screenede celler med den minst ene rekombinante O-RS. For eksempel, virker en CAT identifikasjonsprotokoll eventuelt som en positiv seleksjon og/eller en negativ screening i bestemmelse av passende O-RS rekombinanter. For eksempel, blir en pool av kloner eventuelt replikert på vekstplater inneholdende CAT (som omfatter minst ett selektorkodon) enten med eller uten én eller flere ikke-naturlig kodet(e) aminosyre(r). Kolonier som vokser utelukkende på platene inneholdende ikke-naturlig kodede aminosyrer blir derfor ansett som å inneholde rekombinant O-RS. I ett aspekt av redegjørelsen, blir konsentrasjonen av seleksjons- (og/eller screening) midlet variert. I noen aspekter av redegjørelsen er de første og andre organismene forskjellige. Derfor omfatter den første og/eller andre organismen eventuelt: en prokaryot, en eukaryot, et pattedyr, en *Escherichia coli*, en fungi, en gjær, en erkebakterie, en eubakterie, en plante, et insekt, en protist, etc. I andre utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter screeningmarkøren en fluorescent eller luminescent screeningmarkør eller en affinitetsbasert screeningmarkør.

I en annen utførelsesform av redegjørelsen inkluderer screening eller valg (inkludert men ikke begrenset til, negativt valg) av poolen for aktive (eventuelt mutante) RSer å: isolere poolen av aktive mutante RSer fra det positive seleksjonstrinnet (b); introdusere en negativ seleksjons- eller screeningmarkør, hvori den negative seleksjons- eller screeningmarkøren omfatter minst ett selektorkodon (inkludert men ikke begrenset til, et toksisk markørgen, inkludert men ikke begrenset til, et ribonuklease barnasegen, omfattende minst ett selektorkodon), og poolen av aktive (eventuelt mutante) RSer til en rekke celler av en andre organisme; og identifisere celler som overlever eller viser en spesifikk screeningrespons i et første medium som ikke er supplementert med den ikke-naturlig kodede aminosyren, men mislykkes i å overleve eller viser en spesifikk screeningrespons i et andre medium supplementert med den ikke-naturlig kodede aminosyren, og derved tilveiebringer overlevende eller screenede celler med den minst ene rekombinante O-RSen, hvori den minst ene rekombinante O-RSen er spesifikk for den ikke-naturlig kodede aminosyren. I ett aspekt av redegjørelsen, omfatter det minst ene selektorkodonet omkring to eller flere selektorkodoner. Slike utførelsesformer kan eventuelt inkludere hvori det minst ene selektorkodonet omfatter to eller flere selektorkodoner, og hvori den første og andre organismen er forskjellige (inkludert men ikke

begrenset til, hver organisme er eventuelt, inkludert men ikke begrenset til, en prokaryot, en eukaryot, et pattedyr, en *Escherichia coli*, en fungi, en gjærsopp, en erkebakterie, en eubakterie, en plante, et insekt, en protist, etc.). Også, inkluderer noen aspekter av redegjørelsen hvori den negative seleksjonsmarkøren omfatter et ribonuklease barnase-  
5 gen (som omfatter minst ett selektorkodon). Andre aspekter av redegjørelsen inkluderer hvori screeningmarkøren eventuelt omfatter en fluorescent eller luminescent screeningmarkør eller en affinitetsbasert screeningmarkør. I utførelsesformene av redegjørelsen heri, inkluderer screeningene og/eller seleksjonene eventuelt variasjon av screenings- og/eller seleksjonsstrengheten.

10 I én utførelsesform av redegjørelsen, kan fremgangsmåtene for fremstilling av minst én rekombinant ortogonal aminoacyl-tRNA syntetase (O-RS) videre omfatte å: (d) isolere den minst ene rekombinante O-RSen; (e) generere et andre sett av O-RS (eventuelt mutert) avledet fra den minst ene rekombinante O-RSen; og, (f) gjenta trinnene (b) og (c) inntil en mutert O-RS blir oppnådd som omfatter en evne til å fortrinnsvis aminoacylere  
15 O-tRNAet. Eventuelt, blir trinnene (d)-(f) gjentatt, inkludert men ikke begrenset til, minst omkring to ganger. I ett aspekt av redegjørelsen, kan det andre settet av mutert O-RS avledet fra minst én rekombinant O-RS bli generert ved mutagenese, inkludert men ikke begrenset til, tilfeldig mutagenese, sete-spesifikk mutagenese, rekombinering eller en kombinasjon derav.

20 Strengheten for seleksjons/screeningtrinnene, inkludert men ikke begrenset til, det positive seleksjons/screeningtrinnet (b), det negative seleksjons/screeningtrinnet (c) eller både de positive og negative seleksjons/screeningtrinnene (b) og (c), i fremgangsmåtene beskrevet over, inkluderer eventuelt å variere seleksjons/screeningstrengheten. I en annen utførelsesform av redegjørelsen omfatter det positive seleksjons/screeningtrinnet (b), det  
25 negative seleksjons/screeningtrinnet (c) eller både de positive og negative seleksjons/-screeningtrinnene (b) og (c) anvendelse av en rapportør, hvori rapportøren blir detektert ved fluorescens-aktivert cellesortering (FACS) eller hvori rapportøren blir detektert ved luminescens. Eventuelt er rapportøren fremvist på en celleoverflate, på et fag-display eller lignende og valgt basert på affinitet eller katalytisk aktivitet som involverer den ikke-  
30 naturlig kodede aminosyren eller en analog. I én utførelsesform av redegjørelsen blir den muterte syntetasen fremvist på en celleoverflate, på et fag-display eller lignende.

Fremgangsmåter for å fremstille et rekombinant ortogonalt tRNA (O-tRNA) inkluderer å: (a) generere et bibliotek av mutante tRNAer avledet fra minst ett tRNA, inkludert men ikke begrenset til, et suppressor tRNA, fra en første organisme; (b) velge  
35 (inkludert men ikke begrenset til, negativt velge) eller screene biblioteket for (eventuelt mutante) tRNAer som blir aminoacylert ved en aminoacyl-tRNA syntetase (RS) fra en andre organisme i fraværet av en RS fra den første organismen, og derved tilveiebringe en pool av tRNAer (eventuelt mutante); og, (c) velge eller screene poolen av tRNAer (eventuelt mutante) for elementer som blir aminoacylert ved en introdusert ortogonal RS

(O-RS), og derved tilveiebringe minst ett rekombinant O-tRNA; hvori det minst ene rekombinante O-tRNA gjenkjenner et selektorkodon og ikke blir effektivitetsgjenkjent ved RSen fra den andre organismen og fortrinnsvis blir aminoacylert ved O-RSen. I noen utførelsesformer av redegjørelsen er det minst ene tRNAet et suppressor tRNA og/eller omfatter et unikt tre base-kodon av naturlige og/eller unaturlige baser, eller er et nonsense-kodon, et sjeldent kodon, et unaturlig kodon, et kodon omfattende minst 4 baser, et amberkodon, et ochrekodon eller et opal stoppkodon. I én utførelsesform av redegjørelsen, innehar det rekombinante O-tRNA en forbedring av ortogonalitet. Det vil bli erkjent at i noen utførelsesformer av redegjørelsen, blir O-tRNA eventuelt importert inn i en første organisme fra en andre organisme uten behovet for modifikasjon. I ulike utførelsesformer av redegjørelsen, er de første og andre organismene enten de samme eller forskjellige og er eventuelt valgt fra, inkludert men ikke begrenset til, prokaryoter (inkludert men ikke begrenset til, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Escherichia coli*, *Halobacterium*, etc.), eukaryoter, pattedyr, fungi, gjærsopper, erkebakterier, eubakterier, planter, insekter, protister, etc. I tillegg, er det rekombinante tRNA eventuelt aminoacylert ved en ikke-naturlig kodet aminosyre, hvori den ikke-naturlig kodede aminosyren blir biosyntetisert in vivo enten naturlig eller ved genetisk manipulasjon. Den ikke-naturlig kodede aminosyren blir eventuelt tilsatt til et vekstmedium for minst den første eller andre organismen.

I ett aspekt av redegjørelsen, vil valg (inkludert men ikke begrenset til, negativt valg) eller screening av biblioteket for (eventuelt mutante) tRNAer som blir aminoacylert ved en aminoacyl-tRNA syntetase (trinn (b)) inkludere: å introdusere et toksisk markørgen, hvori det toksiske markørgenet omfatter minst ett av selektorkodonene (eller et gen som fører til produksjonen av et toksisk eller statisk middel eller et gen essensielt for organismen hvori slik markørgen omfatter minst ett selektorkodon) og biblioteket av (eventuelt mutante) tRNAer inn i mange celler fra den andre organismen; og, velge overlevende celler, hvori de overlevende cellene inneholder poolen av (eventuelt mutante) tRNAer omfattende minst ett ortogonalt tRNA eller ikke-funksjonelt tRNA. For eksempel, kan overlevende celler bli valgt ved anvendelse av en sammenligningsforhold celledetthetsundersøkelse.

I et annet aspekt av redegjørelsen, kan det toksiske markørgenet inkludere to eller flere selektorkodoner. I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene, er det toksiske markørgenet et ribonuklease barnase-gen, hvor ribonuklease barnase-genet omfatter minst ett amberkodon. Eventuelt kan ribonuklease barnase-genet inkludere to eller flere amberkodoner.

I én utførelsesform av redegjørelsen, kan valg eller screening av poolen av (eventuelt mutante) tRNAer for elementer som blir aminoacylert ved en introdusert ortogonal RS (O-RS) inkludere å: introdusere et positivt seleksjons- eller screening-markørgen, hvori det positive markørgenet omfatter et legemiddelresistensgen (inkludert

men ikke begrenset til,  $\beta$ -laktamase-gen, omfattende minst ett av selektorkodonene, så som minst ett amber stoppkodon) eller et gen essensielt for organismen, eller et gen som fører til detoksifisering av et toksisk middel, sammen med O-RSen, og poolen av (eventuelt mutante) tRNAer inn i mange celler fra den andre organismen; og, identifisere  
 5 overlevende eller screenede celler dyrket i nærvær av et seleksjons- eller screeningmiddel, inkludert men ikke begrenset til, et antibiotikum, og derved tilveiebringe en pool av celler som innehar det minst ene rekombinante tRNA, hvor det minst ene rekombinante tRNA blir aminoacylert ved O-RSen og setter inn en aminosyre i et translasjonprodukt kodet for ved det positive markørgenet, som svar på det minst ene selektorkodoner. I en annen  
 10 utførelsesform av redegjørelsen, blir konsentrasjonen av seleksjons og/eller screeningmidlet variert.

Fremgangsmåter for å generere spesifikke O-tRNA/O-RS par er tilveiebrakt. Fremgangsmåter inkluderer å: (a) generere et bibliotek av mutante tRNAer avledet fra minst ett tRNA fra en første organisme; (b) negativt velge eller screene biblioteket for  
 15 (eventuelt mutante) tRNAer som blir aminoacylert ved en aminoacyl-tRNA syntetase (RS) fra en andre organisme i fraværet av en RS fra den første organismen, og derved tilveiebringe en pool av (eventuelt mutante) tRNAer; (c) velge eller screene poolen av (eventuelt mutante) tRNAer for elementer som blir aminoacylert ved en introdusert ortogonal RS (O-RS), og derved tilveiebringe minst ett rekombinant O-tRNA. Det minst  
 20 ene rekombinante O-tRNA gjenkjenner et selektorkodon og blir ikke effektivitetsgjenkjent ved RSen fra den andre organismen og blir fortrinnsvis aminoacylert ved O-RSen. Fremgangsmåten inkluderer også å (d) generere et bibliotek av (eventuelt mutante) RSer avledet fra minst én aminoacyl-tRNA syntetase (RS) fra en tredje organisme; (e) velge eller screene biblioteket av mutant RSer for elementer som fortrinnsvis aminoacylerer det  
 25 minst ene rekombinante O-tRNA i nærvær av en ikke-naturlig kodet aminosyre og en naturlig aminosyre, og derved tilveiebringe en pool av aktive (eventuelt mutante) RSer; og, (f) negativt velge eller screene poolen for aktive (eventuelt mutante) RSer som fortrinnsvis aminoacylerer det minst ene rekombinante O-tRNA i fraværet av den ikke-naturlig kodede aminosyren, og derved tilveiebringe det minst ene spesifikke O-tRNA/O-  
 30 RS paret, hvori det minst ene spesifikke O-tRNA/O-RS paret omfatter minst én rekombinant O-RS som er spesifikk for den ikke-naturlig kodede aminosyren og det minst ene rekombinante O-tRNA. Spesifikke O-tRNA/O-RS par produsert ved fremgangsmåtene er inkludert. For eksempel, kan det spesifikke O-tRNA/O-RS paret inkludere, inkludert men ikke begrenset til, et mutRNATyr-mutTyrRS par, så som et mutRNATyr-SS12TyrRS par, et mutRNALeu-mutLeuRS par, et mutRNAThr-mutThrRS par, et  
 35 mutRNAGlu-mutGluRS par eller lignende. I tillegg inkluderer slike fremgangsmåter hvori den første og tredje organismen er de samme (inkludert men ikke begrenset til, *Methanococcus jannaschii*).

Fremgangsmåter for å velge et ortogonalt tRNA-tRNA syntetase-par for bruk i et in vivo translasjonssystem av en andre organisme er også inkludert i foreliggende redegjørelse. Fremgangsmåtene inkluderer å: introdusere et markørgen, et tRNA og en aminoacyl-tRNA syntetase (RS) isolert eller avledet fra en første organisme i et første sett av celler fra den andre organismen; introdusere markørgenet og tRNAet i et duplikat cellesett fra en andre organisme; og, selektene for overlevende celler i det første settet som mislykkes i å overleve i det duplikate cellesettet eller screening for celler som viser en spesifikk screeningrespons som mislykkes i å gi slik respons i det duplikate cellesettet, hvori det første settet og det duplikate cellesettet blir dyrket i nærvær av et seleksjons- eller screeningmiddel, hvori de overlevende eller screenede cellene omfatter det ortogonale tRNA-tRNA syntetaseparet for bruk i in vivo translasjonssystemet av den andre organismen. I én utførelsesform av redegjørelsen, inkluderer sammenligning og selektering eller screening en in vivo komplementeringsundersøkelse. Konsentrasjonen av seleksjons- eller screeningmidlet kan bli variert.

Organismene ifølge foreliggende redegjørelse omfatter et mangfold av organismer og et mangfold av kombinasjoner. For eksempel, kan de første og de andre organismene av fremgangsmåtene ifølge foreliggende redegjørelse være de samme eller forskjellige. I én utførelsesform av redegjørelsen, er organismene eventuelt en prokaryotisk organisme, inkludert men ikke begrenset til, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, eller lignende. Alternativt omfatter organismene eventuelt en eukaryotisk organisme, inkludert men ikke begrenset til, planter (inkludert men ikke begrenset til, komplekse planter så som monokoter eller dikoter), alger, protister, fungi (inkludert men ikke begrenset til, gjær, etc), dyr (inkludert men ikke begrenset til, pattedyr, insekter, artropoder, etc.), eller lignende. I en annen utførelsesform av redegjørelsen, er den andre organismen en prokaryotisk organisme, inkludert men ikke begrenset til, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *Halobacterium*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, eller lignende. Alternativt, kan den andre organismen være en eukaryotisk organisme, inkludert men ikke begrenset til, en gjærsopp, en dyrecelle, en plantecelle, en fungus, en mammalsk celle eller lignende. I ulike utførelsesformer av redegjørelsen er de første og andre organismene forskjellige.

#### ***VI. Lokalisering av ikke-naturlig-forekommende aminosyrer i FGF-21 polypeptider***

Foreliggende oppfinnelse betrakter inkorporering av én eller flere ikke-naturlig-forekommende aminosyrer inn i FGF-21 polypeptider. Én ikke-naturlig-forekommende aminosyre kan bli inkorporert ved en spesiell posisjon som ikke avbryter aktivitet av polypeptidet. Dette kan bli oppnådd ved å gjøre "konservative" substitusjoner, inkludert men ikke begrenset til, substituere hydrofobe aminosyrer med hydrofobe aminosyrer,



omfangsrike aminosyrer for omfangsrike aminosyrer, hydrofile aminosyrer for hydrofile aminosyrer og/eller sette inn den ikke-naturlig-forekommende aminosyren i en lokalisering som ikke er krevet for aktivitet.

Et mangfold av biokjemiske og strukturelle tilnærmelser kan bli anvendt for å velge de ønskede seter for substitusjon med en ikke-naturlig kodet aminosyre innen FGF-21 polypeptidet. Det er lett åpenbart for fagpersonene at en hvilken som helst posisjon av polypeptidkjeden er egnet for seleksjon for å inkorporere en ikke-naturlig kodet aminosyre, og seleksjon kan være basert på rasjonell design eller ved tilfeldig seleksjon for et hvilket som helst eller intet spesielt ønsket formål. Seleksjon av ønskede seter kan være for fremstilling av et FGF-21 molekyl som har en hvilken som helst ønsket egenskap eller aktivitet, inkludert men ikke begrenset til, agonister, super-agonister, inverse agonister, antagonister, reseptorbindingsmodulatorer, reseptoraktivitetsmodulatorer, dimer- eller multimerdannelse, ingen forandring til aktivitet eller egenskap sammenlignet med det naturlige molekylet, eller manipulering av en hvilken som helst fysisk eller kjemisk egenskap av polypeptidet så som løselighet, aggregering eller stabilitet. For eksempel kan lokaliseringer i polypeptidet krevet for biologisk aktivitet av FGF-21 polypeptider bli identifisert ved anvendelse av punktmutasjonsanalyse, alaninscanning, metningsmutagenese og screening for biologisk aktivitet, eller homologe scanningmetoder kjent innen faget. Rester som er kritiske for FGF-21 bioaktivitet, rester som er involvert med farmasøytisk stabilitet, antistoffepitoper, eller reseptor eller heparinbindingsrester kan bli mutert. U.S. patent nr. 5,580,723; 5,834,250; 6,013,478; 6,428,954; og 6,451,561 beskriver fremgangsmåter for den systematiske analysen av strukturen og funksjonen av polypeptider så som FGF-21 ved å identifisere aktive domener som påvirker aktiviteten av polypeptidet med en målsubstans. Rester andre enn de identifisert som kritiske for biologisk aktivitet ved alanin eller homolog scanningmutagenese kan være gode kandidater for substitusjon med en ikke-naturlig kodet aminosyre avhengig av den ønskede aktiviteten søkt for polypeptidet. Alternativt kan setene identifisert som kritiske for biologisk aktivitet også være gode kandidater for substitusjon med en ikke-naturlig kodet aminosyre, igjen avhengig av den ønskede aktiviteten søkt for polypeptidet. Et annet alternativ ville være å ganske enkelt gjøre serielle substitusjoner i hver posisjon på polypeptidkjeden med en ikke-naturlig kodet aminosyre og observere effekten på aktivitetene av polypeptidet. Det er lett åpenbart for fagpersonene at hvilken som helst måte, teknikk eller fremgangsmåte for å velge en posisjon for substitusjon med en ikke-naturlig aminosyre til et hvilket som helst polypeptid er egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse.

En mengde data har allerede blitt samlet ved anvendelse av fremgangsmåtene presentert i denne søknaden og potensielle og fordelaktige seter for mutasjon har blitt funnet og vellykket testet, som beskrevet i eksemplene tilveiebrakt senere i denne spesifikasjonen. Det å finne ytterligere informasjon angående struktur og aktivitet av

mutanter, selv de som inkluderer noen detaljer angående formulering og/eller testing som ikke har blitt spesifikt beskrevet i eksemplene, av FGF-21 polypeptider som inneholder dele sjoner kan også bli gransket for å bestemme regioner av proteinet som det er sannsynlig at er tolerante for substitusjon med en ikke-naturlig kodet aminosyre. På en lignende måte, kan proteasedigerering og monoklonale antistoffer bli brukt for å identifisere regioner av FGF-21 som er ansvarlige for binding av FGF-21 reseptoren. Med én gang rester det er sannsynlig at er intolerante for substitusjon med ikke-naturlig kodede aminosyrer har blitt eliminert, kan virkningen av foreslåtte substitusjoner ved hver av de gjenværende posisjonene bli gransket. Modeller kan bli generert fra de tre-dimensjonale krystallstrukturene av andre FGF-familiemedlemmer og FGF-reseptorer. Protein Data Bank (PDB, tilgjengelig på verdensveven på rcsb.org) er en sentralisert database inneholdende tre-dimensjonale strukturelle data av store molekyler av proteiner og nukleinsyrer. Modeller kan bli laget som undersøker den sekundære og tertiære strukturen av polypeptider, hvis tre-dimensjonale strukturelle data ikke er tilgjengelige. Derfor kan fagpersonene lett identifisere aminosyreposisjoner som kan bli substituert med ikke-naturlig kodede aminosyrer.

I noen utførelsesformer omfatter FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen én ikke-naturlig forekommende aminosyre posisjonert i en region av proteinet som ikke avbryter strukturen av polypeptidet.

Eksempelvis rester av inkorporering av en ikke-naturlig kodet aminosyre kan være de som er utelukket fra potensielle reseptorbindingsregioner, kan være fullstendig eller delvis løsemiddeleksponert, ha minimale eller ingen hydrogen-bindingsvekselvirkninger med nærliggende rester, kan være minimalt eksponert til nærliggende reaktive rester, kan være på én eller flere av de eksponerte flatene, kan være et sete eller seter som er sidestilt til en andre FGF-21, eller annet molekyl eller fragment derav, kan være i regioner som er svært fleksible, eller strukturelt rigide, som forutsagt ved den tre-dimensjonale, sekundære, tertiære eller kvaternære strukturen av FGF-21, bundet eller ubundet til dens reseptor, eller koplet eller ikke koplet til et annet biologisk aktivt molekyl, eller kan modulere konformasjonen av selve FGF-21 eller en dimer eller multimer omfattende én eller flere FGF-21, ved å endre fleksibiliteten eller rigiditeten av den komplette strukturen som ønsket.

Familien av FGF-proteiner har en vanlig  $\beta$ -kløver eller  $\beta$ -plate struktur som identifisert ved krystallografi (Harmer et al., Biochemistry 43:629-640 (2004)). En fagperson erkjenner at slik analyse av FGF-21 muliggjør bestemmelsen av hvilke aminosyrerester som er overflateeksponert sammenlignet med aminosyrerester som er "begravd" innen den tertiære strukturen av proteinet. Det er derfor en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse å substituere en ikke-naturlig kodet aminosyre for en aminosyre som er en overflateeksponert rest.

Én ikke-naturlig kodet aminosyre er inkorporert ved den følgende posisjonen i FGF-21: 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). Den ikke-naturlig forekommende aminosyren er ved 108 posisjonen i FGF-21 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I én utførelsesform, er den ikke-naturlig forekommende aminosyren ved 36 posisjonen i FGF-21 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7).

I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 91 og én annen ikke-naturlig forekommende aminosyre ved én av de følgende posisjoner: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 91 og én annen ikke-naturlig forekommende aminosyre ved én av de følgende posisjoner: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 91 og posisjon 131 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 91 og posisjon 77 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 91 og posisjon 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 131 og posisjon 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 131 og posisjon 77 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 131 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 77 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig

forekommende aminosyre ved posisjon 72 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 87 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 86 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7) sammenknyttet. I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 126 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 110 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 83 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7).

I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 91 og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved én eller flere av de følgende posisjonene: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 91 og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyre(r) ved én eller flere av de følgende posisjonene: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7).

I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 131 og én annen ikke-naturlig forekommende aminosyre ved én eller flere av de følgende posisjonene: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160,

161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 131 og én annen ikke-naturlig forekommende aminosyre ved én eller flere av de følgende posisjonene: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7).

I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 108 og to eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere av de følgende posisjonene: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 108 og to eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere av de følgende posisjonene: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7).

I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 77 og én annen ikke-naturlig forekommende aminosyre ved én eller flere av de følgende posisjonene: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174,

En granskning av krystallstrukturen av FGF-21 eller FGF-familie medlem(mer) og dets vekselvirkning med FOP-reseptoren kan indikere hvilke bestemte aminosyrerester som har sidekjeder som er fullstendig eller delvis tilgjengelige for løsemiddel. Sidekjeden av en ikke-naturlig kodet aminosyre ved disse posisjonene kan peke bort fra

proteinoverflaten og ut i løsemidlet. Den ikke-naturlig forekommende aminosyren ved én av disse posisjonene er knyttet til en vannløselig polymer, inkludert posisjon 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig forekommende aminosyren ved to eller flere av disse posisjonene

5 knyttet til en vannløselig polymer, inkludert men ikke begrenset til, posisjonene: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89,

10 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181,

15 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig forekommende aminosyren ved én eller flere av disse posisjonene knyttet til en vannløselig polymer, inkludert men ikke begrenset til, posisjonene: 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 og 110 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende

20 aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig forekommende aminosyren ved én eller flere av disse posisjonene knyttet til en vannløselig polymer: 10, 52, 77, 117, 126, 131, 162, (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig forekommende aminosyren ved én eller flere av disse posisjonene knyttet til en

25 vannløselig polymer: 87, 77, 83, 72 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig forekommende aminosyren ved én eller flere av disse posisjonene knyttet til en vannløselig polymer: 69, 79, 91, 96, 108 og 110 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I noen utførelsesformer er den ikke-naturlig forekommende aminosyren

30 ved én eller flere av disse posisjonene knyttet til en vannløselig polymer: 91, 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, hvor en ikke-naturlig forekommende aminosyre forekommer ved aminosyre 91 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7) er den ikke-naturlig forekommende

35 aminosyren er knyttet til en vannløselig polymer.

I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 91 knyttet til en vannløselig polymer og én annen ikke-naturlig forekommende aminosyre ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 5 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) 10 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 91 og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyre(r) ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende 15 aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 91 knyttet til en vannløselig polymer og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyre(r) ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 25 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig 30 forekommende aminosyre ved 91 knyttet til en vannløselig polymer og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer som er knyttet til en vannløselig polymer: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 91 knyttet til en vannløselig polymer og to eller 35 flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60,

61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 91 knyttet til en vannløselig polymer og to eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7).

I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 131 knyttet til en vannløselig polymer og én annen ikke-naturlig forekommende aminosyre ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 131 og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyre(r) ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: 91, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 131 knyttet til en vannløselig polymer og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyre(r) ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82,



83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 131 knyttet til en vannløselig polymer og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer som er knyttet til en vannløselig polymer: 91, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 131 knyttet til en vannløselig polymer og to eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 131 knyttet til en vannløselig polymer og to eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: 91, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7).

I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 108 knyttet til en vannløselig polymer og én annen ikke-naturlig forekommende aminosyre ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118,

119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av  
5 proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 108 og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyre(r) ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: 91, 131, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR:  
10 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 108 knyttet til en vannløselig polymer og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyre(r) ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,  
15 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104,  
20 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der  
25 en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 108 knyttet til en vannløselig polymer og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer som er knyttet til en vannløselig polymer: 91, 131, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 108 knyttet til en vannløselig polymer og to eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere  
30 av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57,  
35 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158,

159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 108 knyttet til en vannløselig polymer og to eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: 91, 131, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7).

I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 77 knyttet til en vannløselig polymer og én annen ikke-naturlig forekommende aminosyre ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 77 og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyre(r) ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: 91, 131, 108, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 77 knyttet til en vannløselig polymer og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyre(r) ved én av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178,

179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 77 knyttet til en vannløselig polymer og én eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer som er knyttet til en vannløselig polymer: 91, 131, 108, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 77 knyttet til en vannløselig polymer og to eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). I en annen utførelsesform, er der en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved 77 knyttet til en vannløselig polymer og to eller flere andre ikke-naturlig forekommende aminosyrer ved to eller flere av de følgende posisjonene og disse ikke-naturlig forekommende aminosyrene er knyttet til en vannløselig polymer: 91, 131, 108, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 og 36 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene ifølge SEKV IDer NR: 2-7). Der er en ikke-naturlig forekommende aminosyre ved posisjon 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7) knyttet til en vannløselig polymer.

Et vidt mangfold av ikke-naturlig kodede aminosyrer kan bli substituert for, eller inkorporert i, en gitt posisjon i et FGF-21 polypeptid. Generelt, er en spesiell ikke-naturlig kodedet aminosyre valgt for inkorporering basert på en granskning av den tre dimensjonale krystallstrukturen av et FGF-21 polypeptid eller annet FGF-familiemedlem med dets reseptor, en preferanse for konservative substitusjoner (dvs. aryl-baserte ikke-naturlig kodede aminosyrer, så som p-acetylfenylalanin eller O-propargyltyrosin substituering for Phe, Tyr eller Trp), og den spesifikke konjugeringskjemi som en ønsker å introdusere inn i FGF-21 polypeptidet (f.eks. introduksjonen av 4-azidofenylalanin hvis en ønsker å bevirke en Huisgen [3+2] sykloaddisjon med en vannløselig polymer som bærer en alkynandel eller en amidbindingsdannelse med en vannløselig polymer som bærer en arylester som, i sin tur, inkorporerer en fosfin-andel).

I én utførelsesform av redegjørelsen, inkluderer fremgangsmåten videre å inkorporere den unaturlige aminosyren i proteinet, hvor den unaturlige aminosyren omfatter en første reaktiv gruppe; og bringe proteinet i kontakt med et molekyl (inkludert men ikke begrenset til, et merke, et fargestoff, en polymer, en vann-løselig polymer, et derivat av polyetylenglykol, en fotokryssbinder, et radionuklid, en cytotoxisk forbindelse, et legemiddel, et affinitetsmerke, et fotoaffinitetsmerke, en reaktiv forbindelse, en harpiks, et andre protein eller polypeptid eller polypeptidanalogue, et antistoff eller antistofffragment, en metall-kompleksdanner, en kofaktor, en fettsyre, et karbohydrat, et polynukleotid, et DNA, et RNA, et antisense polynukleotid, et sakkarid, en vann-løselig dendrimer, et syklodekstrin, en inhiberende ribonukleinsyre, et biomateriale, en nanopartikkel, et spinnmerke, en fluorofor, en metall-holdig andel, en radioaktiv andel, en ny funksjonell gruppe, en gruppe som kovalent eller ikke-kovalent vekselvirker med andre molekyler, en fotoaktiverbar andel, en aktinisk strålingseksiterbar andel, en fotoisomeriserbar andel, biotin, et derivat av biotin, en biotinanalog, en andel som inkorporerer et tungt atom, en kjemisk spaltbar gruppe, en fotospaltbar gruppe, en forlenget sidekjede, et karbon-tilknyttet sukker, et redoks-aktivt middel, en amino-tiosyre, en toksisk andel, en isotopisk merket andel, en biofysisk probe, en fosforescent gruppe, en kjemiluminescent gruppe, en elektrontett gruppe, en magnetisk gruppe, en innskytende gruppe, en kromofor, et energioverføringsmiddel, et biologisk aktivt middel, et detekterbart merke, et lite molekyl, et kvantepunkt, en nanotransmitter, et radionukleotid, en radiotransmitter, et nøytron-fange middel, eller en hvilken som helst kombinasjon av de over, eller en hvilken som helst annen ønskelig forbindelse eller substans) som omfatter en andre reaktive gruppe. Den første reaktive gruppen reagerer med den andre reaktive gruppen for å feste molekylet til den unaturlige aminosyren gjennom en [3+2] sykloaddisjon. I én utførelsesform av redegjørelsen, er den første reaktive gruppen en alkynyl- eller azidoandel og den andre reaktive gruppen er en azido- eller alkynylandel. For eksempel, er den første reaktive gruppen alkynylandelen (inkludert men ikke begrenset til, i unaturlig aminosyre p-propargyloksyfenylalanin) og den andre reaktive gruppen er azidoandelen. I et annet eksempel, er den første reaktive gruppen azidoandelen (inkludert men ikke begrenset til, i den unaturlige aminosyren p-azido-L-fenylalanin) og den andre reaktive gruppen er alkynylandelen.

I noen utførelsesformer av redegjørelsen, vil den ikke-naturlig kodede aminosyre substitusjonen(e) bli kombinert med andre addisjoner, substitusjoner eller delesjoner innen FGF-21 polypeptidet for å påvirke andre biologiske karaktertrekk av FGF-21 polypeptidet. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, kan de andre addisjonene, substitusjonene eller delesjonene øke stabiliteten (inkludert men ikke begrenset til, resistens overfor proteolytisk nedbrytning) av FGF-21 polypeptidet eller øke affinitet av FGF-21 polypeptidet for dets reseptor. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, kan de andre addisjonene, substitusjonene eller delesjonene øke den farmasøytiske stabiliteten av

FGF-21 polypeptidet. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, kan de andre addisjonene, substitusjonene eller delesjonene øke løseligheten (inkludert men ikke begrenset til, når uttrykt i *E. coli* eller andre vertsceller) av FGF-21 polypeptidet. I noen utførelsesformer av redegjørelsen kan addisjoner, substitusjoner eller delesjoner øke polypeptidløseligheten etter ekspresjon i *E. coli* eller andre rekombinante vertsceller. I noen utførelsesformer av redegjørelsen er seter valgt for substitusjon med en naturlig kodet eller ikke-naturlig aminosyre i tillegg til et annet sete for inkorporering av en ikke-naturlig aminosyre som resulterer i økning av polypeptidløseligheten etter ekspresjon i *E. coli* eller andre rekombinante vertsceller. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidene en annen addisjon, substitusjon eller delesjon som modulerer affinitet for FGF-21 polypeptidreseptoren, bindingsproteiner eller assosiert ligand, modulerer signaltransduksjon etter binding til FGF-21 reseptoren, modulerer sirkulerende halveringstid, modulerer frigivelse eller bio-tilgjengelighet, fremmer rensing, eller forbedrer eller endrer en spesiell administrasjonsrute. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, omfatter FGF-21 polypeptidene en addisjon, substitusjon eller delesjon som øker affiniteten av FGF-21 varianten for dens reseptor. På lignende måte, kan FGF-21 polypeptider omfatte kjemiske eller enzymspaltingssekvenser, proteasespaltingssekvenser, reaktive grupper, antistoff-bindingsdomener (inkludert men ikke begrenset til, FLAG eller poly-His) eller andre affinitetsbaserte sekvenser (inkludert, men ikke begrenset til, FLAG, poly-His, GST, etc.) eller sammenknyttede molekyler (inkludert, men ikke begrenset til, biotin) som forbedrer deteksjon (inkludert, men ikke begrenset til, GFP), rensing, transport gjennom vev eller cellemembraner, prodrugfrigivelse eller aktivering, FGF-21 størrelsesreduksjon, eller andre karaktertrekk av polypeptidet.

I noen utførelsesformer, genererer substitusjonen av en ikke-naturlig kodet aminosyre en FGF-21 antagonist. I noen utførelsesformer, blir en ikke-naturlig kodet aminosyre substituert eller addert i en region involvert med reseptorbinding. I noen utførelsesformer, blir en ikke-naturlig kodet aminosyre substituert eller addert i en region involvert med heparinbinding. I noen utførelsesformer, omfatter FGF-21 antagonister minst én substitusjon som forårsaker at FGF-21 virker som en antagonist. I noen utførelsesformer, omfatter FGF-21 antagonisten en ikke-naturlig kodet aminosyre knyttet til en vannløselig polymer som foreligger i en reseptorbindingsregion av FGF-21 molekylet.

I aminosyre er substituert med én ikke-naturlig-kodet aminosyre. I noen tilfeller, er den ene ikke-naturlig kodede resten knyttet til én eller flere lavere molekylvekt lineære eller forgrenede PEGer, og forsterker derved bindingsaffinitet og sammenlignbar serumhalveringstid i forhold til typene festet til en enkelt, høyere molekylvekt PEG.

## VII. Ekspresjon i ikke-eukaryoter og eukaryoter

For å oppnå høy-nivå-ekspresjon av et klonet FGF-21 polynukleotid, vil en typisk underklone polynukleotider som koder for et FGF-21 polypeptid ifølge oppfinnelsen inn i en ekspresjonsvektor som inneholder en sterk promoter for direkte transkripsjon, en transkripsjon/translasjonsterminator, og hvis for en nukleinsyre som koder for et protein, et ribosombindingssete for translasjonell initiering. Egnede bakterielle promotere er kjent for fagpersonene og beskrevet, f.eks. i Sambrook *et al.* og Ausubel *et al.*

Bakterielle ekspresjonssystemer for å uttrykke FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen er tilgjengelige i, inkludert men ikke begrenset til, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, og *Salmonella* (Palva *et al.*, Gene 22:229-235 (1983); Mosbach *et al.*, Nature 302:543-545 (1983)). Kits for slike ekspresjonssystemer er kommersielt tilgjengelige. Eukaryotiske ekspresjonssystemer for mammalske celler, gjær og insektceller er kjent for fagpersonene og er også kommersielt tilgjengelige. I tilfeller hvor ortogonale tRNAer og aminoacyl tRNA syntetaser (beskrevet over) blir brukt for å uttrykke FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen, blir vertsceller for ekspresjon valgt basert på deres evne til å bruke de ortogonale komponentene. Eksempelvis inkluderer Gram-positive bakterier (inkludert men ikke begrenset til *B. brevis*, *B. subtilis* eller *Streptomyces*) og Gram-negative bakterier (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), så vel som gjær og andre eukaryotiske celler. Celler omfattende O-tRNA/O-RS par kan bli brukt som beskrevet heri.

En eukaryotisk vertscelle eller ikke-eukaryotisk vertscelle ifølge foreliggende redegjørelse tilveiebringer evnen til å syntetisere proteiner som omfatter unaturlige aminosyrer i store nyttige kvantiteter. I ett aspekt, inkluderer sammensetningen eventuelt, inkludert men ikke begrenset til, minst 10 mikrogram, minst 50 mikrogram, minst 75 mikrogram, minst 100 mikrogram, minst 200 mikrogram, minst 250 mikrogram, minst 500 mikrogram, minst 1 milligram, minst 10 milligram, minst 100 milligram, minst ett gram, eller mer av proteinet som omfatter en unaturlig aminosyre, eller en mengde som kan bli oppnådd med *in vivo* proteinproduksjonsmetoder (detaljer om rekombinant proteinproduksjon og rensing er tilveiebrakt heri). I et annet aspekt, foreligger proteinet eventuelt i sammensetningen ved en konsentrasjon på, inkludert men ikke begrenset til, minst 10 mikrogram protein per liter, minst 50 mikrogram protein per liter, minst 75 mikrogram protein per liter, minst 100 mikrogram protein per liter, minst 200 mikrogram protein per liter, minst 250 mikrogram protein per liter, minst 500 mikrogram protein per liter, minst 1 milligram protein per liter, eller minst 10 milligram protein per liter eller mer, i, inkludert men ikke begrenset til, et cellelysat, en buffer, en farmasøytisk buffer, eller annen flytende suspensjon (inkludert men ikke begrenset til, i et volum på, inkludert men ikke begrenset til, hvor som helst fra omkring 1 nl til omkring 100 l eller mer). Produksjonen av store kvantiteter (inkludert men ikke begrenset til, større enn det som typisk er mulig med andre fremgangsmåter, inkludert men ikke begrenset til, *in vitro*

translasjon) av et protein i en eukaryotisk celle inkludert minst én unaturlig aminosyre er et kjennetegn ifølge oppfinnelsen.

En eukaryotisk vertscelle eller ikke-eukaryotisk vertscelle ifølge foreliggende redegjørelse tilveiebringer evnen til å biosyntetisere proteiner som omfatter unaturlige aminosyrer i store nyttige kvantiteter. For eksempel kan proteiner omfattende en unaturlig aminosyre bli produsert ved en konsentrasjon på, inkludert men ikke begrenset til, minst 10 µg/liter, minst 50 µg/liter, minst 75 µg/liter, minst 100 µg/liter, minst 200 µg/liter, minst 250 µg/liter, eller minst 500 µg/liter, minst 1 mg/liter, minst 2 mg/liter, minst 3 mg/liter, minst 4 mg/liter, minst 5 mg/liter, minst 6 mg/liter, minst 7 mg/liter, minst 8 mg/liter, minst 9 mg/liter, minst 10 mg/liter, minst 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mg/liter, 1 g/liter, 5 g/liter, 10 g/liter eller mer av protein i en celleekstrakt, cellelysate, kulturmedium, en buffer, og/eller lignende.

### I. Ekspresjonssystemer. Kultur og isolering

FGF-21 polypeptider kan bli uttrykt i et hvilket som helst antall egnede ekspresjonssystemer inkludert, for eksempel, gjær, insektceller, mammalske celler og bakterier. En beskrivelse av eksempelvis ekspresjonssystemer er tilveiebrakt under.

Gjær Som brukt heri, inkluderer begrepet "gjær" en hvilken som helst av de ulike gjærsoppene i stand til å uttrykke et gen som koder for et FGF-21 polypeptid. Slike gjærsopper inkluderer, men er ikke begrenset til, askosporogene gjærsopper (*Endomycetales*), basidiosporogene gjærsopper og gjærsopper som tilhører Fungi imperfecti (*Blastomycetes*) gruppen. De askosporogene gjærsoppene er delt inn i to familier, *Spermophthoraceae* og *Saccharomycetaceae*. Sistnevnte er omfattet av fire underfamilier, *Schizosaccharomycoideae* (f.eks. slekten *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* og *Saccharomycoideae* (f.eks. slektene *Pichia*, *Kluyveromyces* og *Saccharomyces*). De basidiosporogene gjærsoppene inkluderer slektene *Leucosporidium*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* og *Filobasidiella*. Gjærsoppene som tilhører Fungi Imperfecti (*Blastomycetes*) gruppen er delt inn i to familier, *Sporobolomycetaceae* (f.eks. slektene *Sporobolomyces* og *Bullera*) og *Cryptococcaceae* (f.eks. slekt *Candida*).

Av spesiell interesse for bruk med foreliggende oppfinnelse er arter innen slektene *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis*, og *Candida*, inkludert, men ikke begrenset til, *P. pastoris*, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa* og *H. polymorpha*.

Seleksjonen av egnet gjær for ekspresjon av FGF-21 polypeptider er innen kunnskapen til en fagperson. Ved valg av gjærverter for ekspresjon, kan egnede verter inkludere de vist å ha, for eksempel, god sekresjonskapasitet, lav proteolytisk aktivitet, god sekresjonskapasitet, god løselig protein produksjon og samlet robusthet. Gjær er



generelt tilgjengelig fra et mangfold av kilder inkludert, men ikke begrenset til, the Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA), og the American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA).

5 Begrepet "gjærvert" eller "gjærvertscelle" inkluderer gjær som kan bli, eller har blitt, brukt som en resipient for rekombinante vektorer eller annen transport DNA. Begrepet inkluderer etterkommerne av den opprinnelige gjærvertscelle som har mottatt de rekombinante vektorene eller annen transport DNA. Det blir forstått at etterkommerne av en enkelt opphavscelle ikke nødvendigvis kan være komplett identisk i morfologi eller i  
10 genomisk eller total DNA komplement til det opprinnelige opphavet, på grunn av tilfeldig eller tilsiktet mutasjon. Etterkommere av opphavscellen som er tilstrekkelig lignende opphavet som skal bli karakterisert ved den relevante egenskapen, så som nærværet av en nukleotidsekvens som koder for et FGF-21 polypeptid, er inkludert i etterkommerne tiltenkt ved denne definisjonen.

15 Ekspresjons- og transformasjonsvektorer, inkludert ekstrakromosomale replikoner eller integrerende vektorer, har blitt utviklet for transformasjon til mange gjærverter. For eksempel, har ekspresjonsvektorer blitt utviklet for *S. cerevisiae* (Sikorski et al., GENETICS (1989) 122:19; Ito et al., J. BACTERIOL. (1983) 153:163; Hinnen et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75:1929); *C. albicans* (Kurtz et al., MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); *C. maltosa* (Kunze et al., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); *H. polymorpha* (Gleeson et al., J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp et al., MOL. GENETICS AND GENOMICS (1986) 202:302); *K. fragilis* (Das et al., J. BACTERIOL. (1984) 158:1165); *K. lactis* (De Louvencourt et al., J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg et al., BIOTECHNOLOGY (NY) (1990)  
20 8:135); *P. guillerimondii* (Kunze et al., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); *P. pastoris* (U.S. patenter nr. 5,324,639; 4,929,555; og 4,837,148; Cregg et al., MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach et al., NATURE (1982) 300:706); og *Y. lipolytica*; *A. nidulans* (Ballance et al., BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilbum et al., GENE (1983) 26:205-221; og Yelton et al.,  
30 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81:1470-74); *A. niger* (Kelly og Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); *T. reesia* (EP 0 244 234); og filamentøse fungi slik som, f.eks. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357).

Kontrollsekvenser for gjærvektorer er kjent for fagpersonene og inkluderer, men er ikke begrenset til, promoterregioner fra gener så som alkoholdehydrogenase (ADH) (EP 0  
35 284 044); enolase; glukokinase; glukose-6-fosfat isomerase; glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase (GAP eller GAPDH); heksokinase; fosfofruktokinase; 3-fosfoglyserat mutase; og pyruvat kinase (PyK) (EP 0 329 203). Gjær PHO5 genet, som koder for syrefosfatase, også kan tilveiebringe nyttige promotersekvenser (Miyano-hara et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1). Andre egnede promotersekvenser for

bruk med gjærverter kan inkludere promoterne for 3-fosfoglyserat kinase (Hitzeman et al., J. BIOL. CHEM. (1980) 255:12073); og andre glykolytiske enzymer, så som pyruvat dekarboksylase, triosefosfat isomerase og fosfoglukose isomerase (Holland et al., BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess et al., J. ADV. ENZYM REG. (1969) 7:149).

5 Induserbare gjærpromotere som har den ytterligere fordel av transkripsjon kontrollert ved vekstbetingelser kan inkludere promoterregionene for alkohol dehydrogenase 2; isocytokrom C; syrefosfatase; metallotionein; glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase; nedbrytende enzymer assosiert med nitrogenmetabolisme; og enzymer ansvarlige for maltose- og galaktoseutnyttelse. Egnede vektorer og promotere for bruk i gjærekspresjon  
10 er videre beskrevet i EP 0 073 657.

Gjærforsterkere også kan bli brukt med gjærpromotere. I tillegg, kan syntetiske promotere også fungere som gjærpromotere. For eksempel, kan de oppstrøms aktiverende sekvenser (UAS) av en gjærpromoter være sammenføyd med den  
15 transkripsjonsaktiverende regionen av en annen gjærpromoter, og danne en syntetisk hybridpromoter. Eksempler på slike hybridpromotere inkluderer den ADH regulatoriske sekvensen knyttet til den GAP transkripsjonsaktiverende regionen. Se U.S. patenter nr. 4,880,734 og 4,876,197. Andre eksempler på hybridpromotere inkluderer promotere som består av de regulatoriske sekvensene av ADH2, GAL4, GAL10 eller PHO5 genene, kombinert med den transkripsjonelle aktiveringsregionen av et glykolytisk enzymgen så  
20 som GAP eller PyK. Se EP 0 164 556. Dessuten kan en gjærpromoter inkludere naturlig forekommende promotere av ikke-gjær opphav som har evnen til å binde gjær RNA polymerase og initiere transkripsjon.

Andre kontrollelementer som kan omfatte del av gjærekspresjonsvektorene inkluderer terminatorer, for eksempel, fra GAPDH eller enolasegenene (Holland et al., J.  
25 BIOL. CHEM. (1981) 256:1385). I tillegg er opphavet for replikering fra 2 $\mu$  plasmid-opphavet egnet for gjær. Et egnet seleksjonsgen for bruk i gjær er *trp1* genet som foreligger i gjærplasmidet. Se Tschumper et al., GENE (1980) 10:157; Kingsman et al., GENE (1979) 7:141. *trp1* genet tilveiebringer en seleksjonsmarkør for en mutant stamme av gjær som mangler evnen til å vokse i tryptofan. På lignende måte, blir *Leu2*-manglende  
30 gjærstammer (ATCC 20,622 eller 38,626) komplementert ved kjente plasmider som bærer *Leu2* genet.

Fremgangsmåter for å introdusere eksogent DNA inn i gjærverter er kjent for fagpersonene, og inkluderer typisk, men er ikke begrenset til, enten transformasjonen av sferoplaster eller av intakte gjærvertsceller behandlet med alkalikationer. For eksempel,  
35 kan transformasjon av gjær bli utført ifølge fremgangsmåten beskrevet i Hsiao et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829 og Van Solingen et al., J. BACT. (1977) 130:946. Andre fremgangsmåter for å introdusere DNA inn i celler så som ved nukleær injeksjon, elektroporering eller protoplastfusjon kan imidlertid også bli brukt som beskrevet generelt i SAMBROOK ET AL., MOLECULAR CLONING: A LAB.

MANUAL (2001). Gjærvertsceller kan så bli kultivert ved anvendelse av standard-teknikker kjent for fagpersonene.

Andre fremgangsmåter for å uttrykke heterologe proteiner i gjærvertsceller er kjent for fagpersonene. *Se generelt* U.S. patentpublikasjon nr. 20020055169, U.S. patenter nr. 6,361,969; 6,312,923; 6,183,985; 6,083,723; 6,017,731; 5,674,706; 5,629,203; 5,602,034; og 5,089,398; U.S. gjentatt granskede patenter nr. RE37,343 og RE35,749; PCT publiserte patentsøknader WO 99/07862; WO 98/37208; og WO 98/26080; Europeiske patentsøknader EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; WO 90/10277; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274; og EP 0 164 556. *Se også* Gellissen et al., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93; Romanos et al., YEAST (1992) 8(6):423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7.

Gjærvertstammene kan bli dyrket i fermentatorer i løpet av amplifiseringstrinnet ved anvendelse av standard semi-kontinuerlige fermenteringsmetoder kjent for fagpersonene. Fermenteringsmetodene kan bli tilpasset for å ta høyde for forskjeller i en spesiell gjærverts karbonutnyttelsesvei eller modus for ekspresjonskontroll. For eksempel, kan fermentering av en *Saccharomyces* gjærvert kreve en enkelt glukosetilførsel, kompleks nitrogenkilde (f.eks. kaseinhydrolysater) og multipl vitamin-supplementering. I motsetning kan den metylotropiske gjæren *P. pastoris* kreve glyserol-, metanol- og spormineraltilførsler, men bare enkle ammonium (nitrogen) salter for optimal vekst og ekspresjon. *Se, f.eks.* U.S. patent nr. 5,324,639; Elliott et al., J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95; og Fieschko et al., BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113.

Slike fermenteringsmetoder, kan imidlertid ha visse felles kjennetegn uavhengig av den anvendte gjærvertstammen. For eksempel kan et vekstbegrensende næringsmiddel, typisk karbon, bli tilsatt til fermentoren i løpet av amplifiseringsfasen for å tillate maksimal vekst. I tillegg anvender fermenteringsmetoder generelt et fermenteringsmedium designet for å inneholde tilstrekkelige mengder av karbon, nitrogen, basale salter, fosfor og andre underordnede næringsmidler (vitaminer, spormineraler og salter, etc.). Eksempler på fermenteringsmedier egnet for bruk med *Pichia* er beskrevet i U.S. patenter nr. 5,324,639 og 5,231,178. WO 2005/091944 beskriver ekspresjonen av FGF-21 i gjær.

Baculovirus-infiserte insektceller Begrepet "insektvert" eller "insekt-vertscelle" angir et insekt som kan bli, eller har blitt, brukt som en resipient for rekombinante vektorer eller annet transport DNA. Begrepet inkluderer etterkommerne av den opprinnelige insekt-vertscellen som har blitt transfektert. Det blir forstått at etterkommerne av en enkelt opphavscelle ikke nødvendigvis er komplett identisk i morfologi eller i genomisk eller total DNA komplement til det opprinnelige opphavet, på grunn av tilfeldig eller tilsiktet mutasjon. Etterkommere av opphavscellen som er tilstrekkelig lignende til opphavet til å bli karakterisert ved den relevante egenskapen, så som nærværet av en nukleotidsekvens som koder for et FGF-21 polypeptid, er inkludert i etterkommerne tiltenkt ved denne definisjonen.

Seleksjonen av egnede insektceller for ekspresjon av FGF-21 polypeptider er kjent for fagpersonene. Flere insekttyper er godt beskrevet innen faget og er kommersielt tilgjengelige inkludert *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* og *Trichoplusia ni*. Ved valg av insektverter for ekspresjon, kan

5 egnede verter inkludere de vist å ha, *inter alia*, god sekresjonskapasitet, lav proteolytisk aktivitet og total robusthet. Insekt er generelt tilgjengelig fra et mangfold av kilder inkludert, men ikke begrenset til, the Insect Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA); og the American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA).

10 Generelt inkluderer komponentene av et baculovirus-infisert insekt ekspresjons-system en overføringsvektor, vanligvis et bakterielt plasmid, som inneholder både et fragment av baculovirusgenomet, og et høvelig restriksjonssete for insersjon av det heterologe genet som skal bli uttrykt; et vill-type baculovirus med sekvenser homologe til

15 det baculovirus-spesifikke fragmentet i overføringsvektoren (dette sørger for den homologe rekombinering av det heterologe genet til baculovirusgenomet); og passende insekt-vertsceller og vekstmedier. Materialene, fremgangsmåtene og teknikkene brukt ved konstruering av vektorer, transfektering av celler, plukking av plakk, dyrking av celler i kultur, og lignende er kjent innen faget og manualer er tilgjengelige som beskriver disse teknikkene.

20 Etter å ha satt det heterologe genet inn i overføringsvektoren, blir vektoren og det vill-type virale genomet transfektert inn i en insekt-vertscelle hvor vektoren og viralt genom rekombinerer. Det pakkede rekombinante viruset blir uttrykt og rekombinante plakk blir identifisert og rensset. Materialer og fremgangsmåter for baculovirus/insektcelle ekspresjonssystemer er kommersielt tilgjengelig i kitform fra, for eksempel, Invitrogen

25 Corp. (Carlsbad, CA). Disse teknikkene er generelt kjent for fagpersonene og fullstendig beskrevet i SUMMERS OG SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987). *Se også*, RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL ET AL., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16,9-

30 16,11 (1994); KING OG POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); og O'REILLY ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

Faktisk er produksjonen av ulike heterologe proteiner ved anvendelse av baculovirus/insektcelle ekspresjonssystemer kjent for fagpersonene. *Se, f.eks.* U.S.

35 patenter nr. 6,368,825; 6,342,216; 6,338,846; 6,261,805; 6,245,528, 6,225,060; 6,183,987; 6,168,932; 6,126,944; 6,096,304; 6,013,433; 5,965,393; 5,939,285; 5,891,676; 5,871,986; 5,861,279; 5,858,368; 5,843,733; 5,762,939; 5,753,220; 5,605,827; 5,583,023; 5,571,709; 5,516,657; 5,290,686; WO02/06305; WO01/90390; WO01/27301; WO01/05956; WO00/55345; WO 00/20032; WO 99/51721; WO 99/45130; WO

99/31257; WO 99/10515; WO 99/09193; WO 97/26332; WO 96/29400; WO 96/25496; WO 96/06161; WO 95/20672; WO 93/03173; WO 92/16619; WO 92/02628; WO 92/01801; WO 90/14428; WO 90/10078; WO 90/02566; WO 90/02186; WO 90/01556; WO 89/01038; WO 89/01037; WO 88/07082.

5 Vektorer som er nyttige i baculovirus/insektcelle ekspresjonssystemer er kjent innen faget og inkluderer, for eksempel, insektekspresjon og overføringsvektorer avledet fra baculoviruset *Autographacalifornica* nukleær polyhedrose virus (AcNPV), som er en  
 10 hjelper-uavhengig, viral ekspresjonsvektor. Virale ekspresjonsvektorer avledet fra dette systemet bruker vanligvis den sterke virale polyhedrin-gen-promoterer for å drive ekspresjon av heterologe gener. *Se generelt*, O'Reilly ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

Før innsetting av det fremmede genet i baculovirus genomet, blir komponentene beskrevet over, omfattende en interessant promoter, leder (hvis ønsket), kodende sekvens, og transkripsjonstermineringssekvens, typisk satt sammen til et intermediært trans-  
 15 passerende konstrukt (overføringsvektor). Intermediære transpasserende konstrukt blir ofte opprettholdt i et replikon, så som et ekstrakromosomalt element (f.eks. plasmider) som er i stand til stabilt vedlikehold i en vert, så som bakterier. Replikonen vil ha et replikeringsystem, og tillater det derfor å bli opprettholdt i en egnet vert for kloning og  
 20 amplifisering. Mer spesifikt kan plasmidet inneholde polyhedrin polyadenyleringssignalet (Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177) og et prokaryotisk ampicillin-resistens (*amp*) gen og opphav for replikering for seleksjon og propagering i *E. coli*.

Én vanlig brukt overføringsvektor for å introdusere fremmede gener inn i AcNPV er pAc373. Mange andre vektorer, kjent for fagpersonene, har også blitt designet  
 25 inkludert, for eksempel, pVL985, som endrer polyhedrinstartkodonet fra ATG til ATT, og som introduserer et BamHI kloningssete 32 basepar nedstrøms fra ATT. *Se* Luckow og Summers, VIROLOGY 170:31 (1989). Andre kommersielt tilgjengelige vektorer inkluderer, for eksempel, PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Etter insersjon av det heterologe genet, blir overføringsvektoren og det vill-type  
 30 baculovirale genomet ko-transfektet til en insektcellevert. Fremgangsmåter for å introdusere heterologt DNA i det ønskede setet i baculovirus viruset er kjent innen faget. *Se* SUMMERS OG SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987); Smith et al., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156; Luckow og Summers, VIROLOGY (1989) 170:31. For eksempel, kan insersjonen være til et gen  
 35 så som polyhedrin-genet, ved homolog dobbel overkrysningsrekombinering; insersjon kan også være til et restriksjonsenzymsete snekret inn i det ønskede baculovirus genet. *Se* Miller et al., BIOESSAYS (1989) 11(4):91.

Transfeksjon kan bli gjennomført ved elektroporering. *Se* TROTTER OG WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann og King, J. GEN. VIROL.

(1989) 70:3501. Alternativt, kan liposomer bli brukt for å transfektere insektcellene med den rekombinante ekspresjonsvektoren og baculoviruset. *See, e.g.*, Liebman et al., BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36; Graves et al., BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050; Nomura et al., J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22):13570; Schmidt et al., PROTEIN  
 5 EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Siffert et al., NATURE  
 GENETICS (1998) 18:45; TILKINS ET AL., CELL BIOLOGY: A LABORATORY  
 HANDBOOK 145-154 (1998); Cai et al., PROTEIN EXPRESSION AND  
 PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin et al., NATURE GENETICS (1997) 17:491;  
 Kost et al., GENE (1997) 190:139; Jakobsson et al., J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203;  
 10 Rowles et al., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37):22376; Revere et al., J. BIOL. CHEM.  
 (1996) 271(39):23607-10; Stanley et al., J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk et al., J.  
 VIROL. (1994) 68(2):766; og Peng et al., BIOTECHNIQUES (1993) 14(2):274.  
 Kommersielt tilgjengelige liposomer inkluderer, for eksempel, Cellfectin® og  
 Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA). I tillegg, kan kalsiumfosfattransfeksjon bli  
 15 brukt. *Se* TROTTER og WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995);  
 Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; og Mann og King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501.

Baculovirus-ekspresjonsvektorer inneholder vanligvis en baculovirus-promoter. En baculovirus-promoter er en hvilken som helst DNA-sekvens som er i stand til å binde en baculovirus RNA polymerase og initiere nedstrøms (3') transkripsjonen av en kodende  
 20 sekvens (f.eks. strukturelt gen) inn i mRNA. En promoter vil ha en transkripsjons-  
 initierende region som vanligvis er plassert proksimalt til 5' enden av den kodende  
 sekvensen. Denne transkripsjonsinitierende regionen inkluderer typisk et RNA  
 polymerase bindingssete og et transkripsjonsinitierende sete. En baculovirus-promoter  
 kan også ha et andre domene kalt en enhancer, som, hvis det foreligger, vanligvis er  
 25 distalt til det strukturelle genet. Ekspresjon kan dessuten være enten regulert eller  
 konstitutiv.

Strukturelle gener, rikelig transkribert på sene tidspunkter i infeksjonssyklusen, tilveiebringer spesielt nyttige promotersekvenser. Eksempler inkluderer sekvenser avledet fra genet som koder for det virale polyhedronproteinet (FRIESEN ET AL., The  
 30 Regulation of Baculovirus Gene Expression i THE MOLECULAR BIOLOGY OF  
 BACULOVIRUSES (1986); EP 0 127 839 og 0 155 476) og genet som koder for p10  
 proteinet (Vlak et al., J. GEN. VIROL. (1988) 69:765).

Den nylig dannede baculovirus-ekspresjonsvektoren blir pakket inn i et rekombinant baculovirus og deretter kan dyrkede plakk bli rensset ved teknikker kjent for  
 35 fagpersonene. *Se* Miller et al., BIOESSAYS (1989) 11(4):91; SUMMERS OG SMITH,  
 TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555(1987).

Rekombinante baculovirus-ekspresjonsvektorer har blitt utviklet for infeksjon i mange insektceller. For eksempel, har rekombinante baculovirus blitt utviklet for, *inter alia*, *Aedes aegypti* (ATCC nr. CCL-125), *Bombyx mori* (ATCC nr. CRL-8910),

*Drosophila melanogaster* (ATCC nr. 1963), *Spodoptera frugiperda*, og *Trichoplusia ni*. Se Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell et al., J. VIROL. (1985) 56:153; Smith et al., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156. Se generelt, Fraser et al., IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225. Mer spesifikt, inkluderer cellelinjene brukt for baculovirus-ekspressjonsvektorsystemer vanligvis, men er ikke begrenset til, Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (ATCC nr. CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp., Cat. nr. 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-368 (*Trichopulsia ni*), og High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (*Trichopulsia ni*).

Celler og kulturmedier er kommersielt tilgjengelige for både direkte og fusjons-ekspressjon av heterologe polypeptider i et baculovirus/ekspressjon, og cellekulturteknologi er generelt kjent for fagpersonene.

*E. Coli, Pseudomonas typer, og andre prokaryoter* Bakterielle ekspressjonsteknikker er kjent for fagpersonene. En lang rekke vektorer er tilgjengelige for bruk i bakteriell verter. Vektorene kan være enkelt kopi eller lav eller høy multikopi vektorer. Vektorer kan tjene for kloning og/eller ekspressjon. I lys av den rikholdige litteraturen vedrørende vektorer, kommersielle tilgjengelighet av mange vektorer, og til og med manualer som beskriver vektorer og deres restriksjonskart og karakteristikk, er det ikke krevet noen omfattende diskusjon her. Slik det er velkjent, involverer vektorene normalt markører som sørger for seleksjon, disse markørene kan sørge for cytotoxisk middel resistens, prototrofi eller immunitet. Hyppig foreligger flere markører, som sørger for forskjellige karakteristikk.

En bakteriell promoter er en hvilken som helst DNA sekvens som er i stand til å binde bakteriell RNA polymerase og initiere nedstrøms (3') transkripsjonen av en kodende sekvens (f.eks. strukturelt gen) inn i mRNA. En promoter vil ha en transkripsjonsinitierende region som vanligvis er plassert proksimalt til 5' enden av den kodende sekvensen. Denne transkripsjonsinitierende regionen inkluderer typisk et RNA polymerase-bindingssete og et transkripsjonsinitieringssete. En bakteriell promoter kan også ha et andre domene kalt en operator, som kan overlape et tilgrensende RNA polymerase-bindingssete som RNA syntese begynner ved. Operatoren tillater negativt regulert (induserbar) transkripsjon, ettersom et genrepressorprotein kan binde operatoren og derved inhibere transkripsjon av et spesifikt gen. Konstitutiv ekspressjon kan forekomme i fraværet av negative regulatoriske elementer, så som operatoren. I tillegg kan positiv regulering bli oppnådd ved en genaktivator-proteinbindingssekvens, som, hvis den foreligger, vanligvis er proksimal (5') til RNA polymerase-bindingssekvensen. Et eksempel på et genaktivatorprotein er katabolittaktivatorproteinet (CAP), som bidrar til å initiere transkripsjon av lac-operonet i *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud et al., ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. Regulert ekspressjon kan derfor være enten positiv eller negativ, og derved enten forsterke eller redusere transkripsjon.

Sekvenser som koder for metabolsk vei-enzymmer tilveiebringer spesielt nyttige promotersekvenser. Eksempler inkluderer promotersekvenser avledet fra sukker-metaboliserende enzymmer, så som galaktose, laktose (lac) [Chang et al., NATURE (1977) 198:1056] og maltose. Ytterligere eksempler inkluderer promotersekvenser avledet fra biosyntetiske enzymmer så som tryptofan (trp) [Goeddel et al., NUC. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton et al., NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731; U.S. pat. nr. 4,738,921; EP Pub. nr. 036 776 og 121 775].  $\beta$ -galaktosidase (bla) promotersystemet [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." I Interferon 3 (red. I. Gresser)], tilveiebringer bakteriofag lambda PL [Shimatake et al., NATURE (1981) 292:128] og T5 [U.S. pat. nr. 4,689,406] promotersystemer også nyttige promotersekvenser. Foretrukne fremgangsmåter ifølge foreliggende redegjørelse utnytter sterke promotere, så som T7 promoteren for å indusere FGF-21 polypeptider ved høye nivåer. Eksempler på slike vektorer er kjent for fagpersonene og inkluderer pET29 seriene fra Novagen, og pPOP vektorene beskrevet i WO99/05297. Slike ekspresjonssystemer tilvirker høye nivåer av FGF-21 polypeptider i verten uten å gå på bekostning av vertscellelevedyktighet eller vekstparametere. pET19 (Novagen) er en annen vektor kjent innen faget.

I tillegg fungerer syntetiske promotere som ikke forekommer i naturen også som bakterielle promotere. For eksempel kan transkripsjonsaktiverende sekvenser av én bakteriell eller bakteriofag promoter bli sammenføydd med operonsekvensene av en annen bakteriell eller bakteriofag promoter, og danne en syntetisk hybridpromoter [U.S. pat. nr. 4,551,433]. For eksempel, er tac-promoteren en hybrid trp-lac promoter omfattet av både trp promoter- og lac operon-sekvenser som er regulert ved lac-repressoren [Amann et al., GENE (1983) 25:167; de Boer et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]. Dessuten kan en bakteriell promoter inkludere naturlig forekommende promotere av ikke-bakterielt opphav som har evnen til å binde bakteriell RNA polymerase og initiere transkripsjon. En naturlig forekommende promoter av ikke-bakterielt opphav kan også bli koplet med en kompatibel RNA polymerase for å tilvirke høye nivåer av ekspresjon av noen gener i prokaryoter. Bakteriofag T7 RNA polymerase/promoter-systemet er et eksempel på et koplet promotersystem [Studier et al., J. MOL. BIOL. (1986) 189:113; Tabor et al., Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]. I tillegg kan en hybridpromoter også være omfattet av en bakteriofag promoter og en E. coli operatorregion (EP Pub. nr. 267 851).

I tillegg til en fungerende promotersekvens, er et effektivt ribosombindingssete også nyttig for ekspresjonen av fremmede gener i prokaryoter. I E. coli, blir ribosombindingssetet kalt Shine-Dalgarno (SD) sekvensen og inkluderer et initieringskodon (ATG) og en sekvens 3-9 nukleotider i lengde lokalisert 3-11 nukleotider oppstrøms for initieringskodonet [Shine et al., NATURE (1975) 254:34]. SD-sekvensen er tenkt å fremme binding av mRNA til ribosomet ved paringen av baser mellom SD-sekvensen og den 3' og av E. coli 16S rRNA [Steitz et al. "Genetic signals and nucleotide sequences in



messenger RNA", I Biological Regulation and Development: Gene Expression (red. R. F. Goldberger, 1979)]. For å uttrykke eukaryotiske gener og prokaryotiske gener med svakt ribosom-bindingssete [Sambrook et al. "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

5 Begrepet "bakteriell vert" eller "bakteriell vertscelle" angir en bakterie som kan bli, eller har blitt, brukt som en resipient for rekombinante vektorer eller annen transport DNA. Begrepet inkluderer etterkommerne av den opprinnelige bakterielle vertscelle som har blitt transfektert. Det blir forstått at etterkommerne av en enkelt opphavscelle ikke nødvendigvis er komplett identisk i morfologi eller i genomisk eller totalt DNA  
10 komplement til det opprinnelige opphavet, på grunn av tilfeldig eller tilsiktet mutasjon. Etterkommere av opphavscellen som er tilstrekkelig lignende til opphavet til å bli karakterisert ved den relevante egenskapen, så som nærværet av en nukleotidsekvens som koder for et FGF-21 polypeptid, er inkludert i etterkommerne tiltenkt ved denne definisjon.

15 Seleksjonen av egnede vertsbakterier for ekspresjon av FGF-21 polypeptider er kjent for fagpersonene. Ved å velge bakterielle verter for ekspresjon, kan egnede verter inkludere de vist å ha, *inter alia*, god kapasitet for dannelse av inklusjonslegeme, lav proteolytisk aktivitet og total robusthet. Bakterielle verter er generelt tilgjengelige fra et mangfold av kilder inkludert, men ikke begrenset til, the Bacterial Genetic Stock Center,  
20 Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA); og the American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA). Industriell/farmasøytisk fermentering bruker generelt bakterier avledet fra K stammer (f.eks. W3110) eller fra bakterier avledet fra B stammer (f.eks. BL21). Disse stammene er spesielt nyttige fordi deres vekstparametere er ekstremt velkjente og robuste. I tillegg er  
25 disse stammene ikke-patogene, noe som er kommersielt viktig av sikkerhets- og miljømessige årsaker. Andre eksempler på egnede *E. coli* verter inkluderer, men er ikke begrenset til, stammer av BL21, DH10B, eller derivater derav. I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, er *E. coli* verten en protease minus stamme inkludert, men ikke begrenset til, OMP- og LON-. Vertscellestammen kan være  
30 en type av *Pseudomonas*, inkludert men ikke begrenset til, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Pseudomonas putida*. *Pseudomonas fluorescens* biovar 1, betegnet stamme MB101, er kjent for å være nyttig for rekombinant produksjon og er tilgjengelig for terapeutiske proteinproduksjonsprosesser. Eksempler på et *Pseudomonas* ekspresjonssystem inkluderer systemet tilgjengelig fra The Dow Chemical Company som  
35 en vertsstamme (Midland, MI tilgjengelig på verdensveven på [dow.com](http://dow.com)).

Med én gang en rekombinant vertscellestamme har blitt etablert (dvs. ekspresjonskonstruktet har blitt introdusert inn i vertscellen og vertsceller med det riktige ekspresjonskonstruktet er isolert), blir den rekombinante vertscellestammen kultivert under betingelser passende for produksjon av FGF-21 polypeptider. Som det vil være

åpenbart for en fagperson, vil fremgangsmåten for kultur av den rekombinante vertscellestammen være avhengig av naturen av det utnyttede ekspresjonskonstruktet og identiteten av vertscellen. Rekombinante vertsstammer blir normalt kultivert ved anvendelse av fremgangsmåter som er kjent for fagpersonene. Rekombinante vertsceller  
5 blir typisk kultivert i flytende medium inneholdende assimilerbare kilder til karbon, nitrogen og uorganisk salter og, eventuelt, inneholdende vitaminer, aminosyrer, vekstfaktorer og andre protein-holdige kultursupplementer kjent for fagpersonene. Flytende medier for kultur av vertsceller kan eventuelt inneholde antibiotika eller anti-fungaler for å forhindre veksten av uønskede mikroorganismer og/eller forbindelser  
10 inkludert, men ikke begrenset til, antibiotika for å velge for vertsceller inneholdende ekspresjonsvektoren.

Rekombinante vertsceller kan bli kultivert i satsvise eller kontinuerlige formater, med enten cellehøsting (i tilfellet hvor FGF-21 polypeptidet akkumulerer intracellulært) eller høsting av kultursupernatant i enten satsvise eller kontinuerlige formater. For  
15 produksjon i prokaryotiske vertsceller, er satsvis kultur og cellehøsting foretrukket.

FGF-21 polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse blir normalt rensset etter ekspresjon i rekombinante systemer. FGF-21 polypeptidet kan bli rensset fra vertsceller eller kulturmedium ved et mangfold av fremgangsmåter kjent innen faget. FGF-21 polypeptider produsert i bakterielle vertsceller kan være dårlig løselig eller uløselig (i  
20 form av inklusjonslegemer). I én utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, kan aminosyresubstitusjoner lett bli gjort i FGF-21 polypeptidet som er valgt for formålet av å øke løseligheten av det rekombinant produserte proteinet ved å utnytte fremgangsmåtene vist heri så vel som de kjent innen faget. I tilfellet med uløselig protein, kan proteinet bli samlet fra vertscellelysater ved sentrifugering og kan videre bli fulgt av homogenisering  
25 av cellene. I tilfellet med dårlig løselig protein, kan forbindelser inkludert, men ikke begrenset til, polyetylenimin (PEI) bli tilsatt for å indusere utfellingen av delvis løselig protein. Det utfelte proteinet kan så bli passende samlet ved sentrifugering. Rekombinante vertsceller kan bli brutt ned eller homogenisert for å frigi inklusjonslegemene fra innen cellene ved anvendelse av et mangfold av fremgangsmåter kjent for fagpersonene.  
30 Vertscelledbrytning eller homogenisering kan bli utført ved anvendelse av velkjente teknikker inkludert, men ikke begrenset til, enzymatisk celledbrytning, ultralyd-behandling, dounce homogenisering, eller nedbrytning ved frigivelse ved høyt trykk. I én utførelsesform av fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse, blir teknikken for frigivelse ved høyt trykk brukt for å bryte ned *E. coli* vertscellene for å frigi inklusjonslegemene av FGF-21 polypeptidene. Når en håndterer inklusjonslegemer av FGF-21 polypeptid, kan det være fordelaktig å minimere homogeniseringstiden på repetisjoner for  
35 å maksimere utbyttet av inklusjonslegemer uten tap på grunn av faktorer så som solubilisering, mekanisk skjærbehandling eller proteolyse.

Uløselig eller utfelt FGF-21 polypeptid kan så bli solubilisert ved anvendelse av et hvilket som helst av flere egnede solubiliseringsmidler kjent innen faget. FGF-21 polypeptidet kan bli solubilisert med urea eller guanidin hydroklorid. Volumet av det solubiliserte FGF-21 polypeptidet skulle bli minimert slik at store porsjoner kan bli produsert ved anvendelse av passende håndterbare ansatsstørrelser. Denne faktoren kan være signifikant i en stor-skala kommersiell setting hvor den rekombinante verten kan bli dyrket i ansatser som er tusenvis av liter i volum. I tillegg, når en produserer FGF-21 polypeptid i en stor-skala kommersiell setting, spesielt for humane farmasøytiske bruksområder, skulle unngåelsen av strenge kjemikalier som kan skade maskineriet og beholderen, eller selve proteinproduktet bli unngått, hvis mulig. Det har blitt vist i fremgangsmåten ifølge foreliggende redegjørelse at det mildere denatureringsmidlet urea kan bli brukt for å solubilisere FGF-21 polypeptidinklusionslegemene istedenfor det strengere denatureringsmidlet guanidinhydroklorid. Anvendelsen av urea reduserer signifikant risikoen for skade på rustfritt stålutstyr utnyttet i produksjons- og renseprosessen av FGF-21 polypeptid mens det effektivt solubiliserer FGF-21 polypeptidinklusionslegemene.

I tilfellet av løselig FGF-21 protein, kan FGF-21en bli utsondret til det periplasmiske rommet eller til kulturmediet. For eksempel ble FGF-21 utsondret til det periplasmiske rommet av W3110-B2 celler ved anvendelse av plasmider som koder for konstrukter inkludert åtte forskjellige ledersekvenser, inkludert de listet i SEKV IDer NR: 39-44, og transformere disse til W3110-B2 celler, cellene ble så dyrket ved 37 °C inntil OD nådde omkring 0,8, ved hvilket punkt ekspresjonen ble induisert med 0,01 % arabinose. Fem timer senere ble de periplasmiske frigivelsesprøvene preparert fra kulturene og kjørt på gelene (Figur 33) som viser total ekspresjon (totale lysater) og periplasmiske utsondringer (løselig fraksjon).

I tillegg, kan løselig FGF-21 foreligge i cytoplasmaet av vertscellene. Det kan være ønsket å konsentrere løselig FGF-21 før en utfører rensetrinnene. Standardteknikker kjent for fagpersonene kan bli brukt for å konsentrere løselig FGF-21 fra, for eksempel, cellelysater eller kulturmedium. I tillegg kan standardteknikker kjent for fagpersonene bli brukt for å bryte ned vertsceller og frigi løselig FGF-21 fra cytoplasmaet eller det periplasmiske rom av vertscellene.

Når FGF-21 polypeptid blir produsert som et fusjonsprotein, kan fusjonssekvensen bli fjernet. Fjerning av en fusjonssekvens kan bli gjennomført ved enzymatisk eller kjemisk spalting. Enzymatisk fjerning av fusjonssekvenser kan bli gjennomført ved anvendelse av fremgangsmåter kjent for fagpersonene. Valget av enzym for fjerning av fusjonssekvensen vil bli bestemt ved identiteten av fusjonen, og reaksjonsbetingelsene vil bli spesifisert ved valget av enzym som vil være åpenbart for en fagperson. Kjemisk spalting kan bli gjennomført ved anvendelse av reagenser kjent for fagpersonene, inkludert men ikke begrenset til, cyanogenbromid, TEV protease og andre reagenser. Det

spaltede FGF-21 polypeptidet kan bli rensset fra den spaltede fusjonssekvensen ved fremgangsmåter kjent for fagpersonene. Slike fremgangsmåter vil bli bestemt ved identiteten og egenskapene av fusjonssekvensen og FGF-21 polypeptidet, som vil være åpenbart for en fagperson. Fremgangsmåter for rensing kan inkludere, men er ikke  
5 begrenset til, størrelsesutelukkeskromatografi, hydrofob vekselvirkningskromatografi, ionebyttekromatografi eller dialyse eller en hvilken som helst kombinasjon derav.

FGF-21 polypeptidet kan også bli rensset for å fjerne DNA fra proteinløsningen. DNA kan bli fjernet ved en hvilken som helst egnet fremgangsmåte kjent innen faget, så som utfelling eller ionebyttekromatografi, men kan bli fjernet ved utfelling med et  
10 nukleinsyre utfellingsmiddel, slik som, men ikke begrenset til, protaminsulfat. FGF-21 polypeptidet kan bli separert fra det utfelte DNAet ved anvendelse av standard velkjente fremgangsmåter inkludert, men ikke begrenset til, sentrifugering eller filtrering. Fjerning av vertsnukleinsyremolekyler er en viktig faktor i en setting hvor FGF-21 polypeptidet skal bli brukt for å behandle mennesker og fremgangsmåtene ifølge foreliggende  
15 oppfinnelse redusere vertscelle DNA til farmasøytisk akseptable nivåer.

Fremgangsmåter for fermentering av liten-skala eller stor-skala kan også bli brukt i proteinekspresjon, inkludert men ikke begrenset til, fermentatorer, ristekolber, fluidisert sjikt bioreaktorer, hulfiber bioreaktorer, rulleflaske kultursystemer og omrørt tank bioreaktorsystemer. Hver av disse fremgangsmåtene kan bli utført i en satsvis, semi-  
20 kontinuerlig eller kontinuerlig modus prosess.

Humane FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen kan generelt bli utvunnet ved anvendelse av fremgangsmåter standard innen faget. For eksempel kan kulturmedium eller cellelysate bli sentrifugert eller filtrert for å fjerne cellulært avfall. Supernatanten kan bli konsentrert eller fortynnet til et ønsket volum eller diafiltrert til en egnet buffer for å  
25 kondisjonere preparatet for videre rensing. Videre rensing av FGF-21 polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer å separere deamiderte og klippede former av FGF-21 polypeptidvarianten fra den intakte formen.

En hvilken som helst av de følgende eksempelvis prosedyrer kan bli anvendt for rensing av FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen: affinitetskromatografi; anion- eller  
30 kationbyttekromatografi (ved anvendelse av, inkludert men ikke begrenset til, DEAE SEPHAROSE); kromatografi på silika; høytytelsesvæskekromatografi (HPLC); omvendt fase HPLC; gelfiltrering (ved anvendelse av, inkludert men ikke begrenset til, SEPHADEX G-75); hydrofob vekselvirkningskromatografi; størrelsesutelukkeskromatografi; metall-chelat-kromatografi; ultrafiltrering/diafiltrering;  
35 etanolutfelling; ammoniumsulfatutfelling; kromatofokusering; forskyvningskromatografi; elektroforetiske prosedyrer (inkludert men ikke begrenset til preparativ isoelektrisk fokusering), differensiell løselighet (inkludert men ikke begrenset til ammoniumsulfatutfelling), SDS-PAGE eller ekstraksjon.

Proteiner ifølge foreliggende oppfinnelse, inkludert men ikke begrenset til, proteiner omfattende unaturlige aminosyrer, peptider omfattende unaturlige aminosyrer, antistoffer til proteiner omfattende unaturlige aminosyrer, bindingspartnere for proteiner omfattende unaturlige aminosyrer, etc., kan bli rensset, enten delvis eller hovedsakelig til homogenitet, ifølge standardprosedyrer kjent for og brukt av fagfolkene. Følgelig, kan polypeptider ifølge oppfinnelsen bli utvunnet og rensset ved en hvilken som helst av flere fremgangsmåter kjent for fagpersonene, inkludert men ikke begrenset til, ammonium-sulfat eller etanolutfelling, syre- eller baseekstraksjon, kolonnekromatografi, affinitets-kolonnekromatografi, anion- eller kationbyttekromatografi, fosfocellulosekromatografi, hydrofob vekselvirkningskromatografi, hydroksylapatittkromatografi, lektinkromatografi, gelelektroforese og lignende. Proteinrefoldingstrinn kan bli brukt, ettersom ønsket, ved fremstilling av korrekt foldede modne proteiner. Høytytelsesvæskekromatografi (HPLC), affinitetskromatografi eller andre egnede fremgangsmåter kan bli anvendt i endelige rensetrinn hvor høy renhet er ønsket. I én utførelsesform, blir antistoffer laget mot unaturlige aminosyrer (eller proteiner eller peptider omfattende unaturlige aminosyrer) brukt som rensereagenser, inkludert men ikke begrenset til, for affinitetsbasert rensing av proteiner eller peptider omfattende én eller flere unaturlige aminosyre(r). Med én gang de er rensset, delvis eller til homogenitet, ettersom ønsket, blir polypeptidene eventuelt brukt for en lang rekke anvendelser, inkludert men ikke begrenset til, som analysekomponenter, terapeutika, profylakse, diagnostika, forskningsreagenser, og/eller som immunogener for antistoffproduksjon. Antistoffer generert mot polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli oppnådd ved administrering av polypeptidene eller epitop-bærende fragmenter, eller celler til et dyr, fortrinnsvis et ikke-humant dyr, ved anvendelse av rutineprotokoller. En fagperson kunne generere antistoffer ved anvendelse av et mangfold av kjente teknikker. Transgene mus, eller andre organismer, inkludert andre pattedyr, kan også bli brukt for å uttrykke humaniserte antistoffer. Antistoffene beskrevet over kan bli anvendt for å isolere eller for å identifisere kloner som uttrykker polypeptidet eller for å rense polypeptidene. Antistoffer overfor polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli anvendt for å behandle sykdommer.

Polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse og polynukleotider vist heri kan også bli brukt som vaksiner. Følgelig, i et videre aspekt, omhandler foreliggende redegjørelse en fremgangsmåte for å indusere en immunologisk respons i et pattedyr som omfatter inokulering av pattedyret med et polypeptid ifølge foreliggende oppfinnelse, tilstrekkelig for å tilvirke antistoff og/eller T-celle immunrespons, inkludert, for eksempel, cytokinproduserende T-celler eller cytotoksiske T-celler, for å beskytte nevnte dyr mot sykdom, enten den sykdommen allerede er etablert innen individet eller ikke. En immunologisk respons i et pattedyr kan også bli indusert ved en fremgangsmåte som omfatter å levere et polypeptid ifølge foreliggende oppfinnelse via en vektorstyrende ekspresjon av polynukleotidet og koding for polypeptidet in vivo for å indusere er slik immunologisk

respons for å tilvirke antistoff for å beskytte nevnte dyr mot sykdommer ifølge redegjørelsen. Én måte å administrere vektoren på er ved å akselerere den til de ønskede cellene som et belegg på partikler eller på annen måte. Slik nukleinsyrevektor kan omfatte DNA, RNA, en modifisert nukleinsyre, eller en DNA/RNA-hybrid. For bruk som en vaksine, vil et polypeptid eller en nukleinsyrevektor normalt bli tilveiebrakt som en vaksineformulering (sammensetning). Formuleringen kan videre omfatte en egnet bærer. Siden et polypeptid kan bli brutt ned i magen, kan det bli administrert parenteralt (for eksempel, subkutan, intramuskulær, intravenøs eller intra-dermal injeksjon).

Formuleringer egnet for parenteral administrasjon inkluderer vandige og ikke-vandige sterile injeksjonsløsninger som kan inneholde antioksidanter, buffere, bakteriostater og oppløste stoffer som gjør formuleringen instonisk med blodet til resipienten; og vandige og ikke-vandige sterile suspensjoner som kan inkludere suspenderingsmidler eller fortykningsmidler. Vaksineformuleringen kan også inkludere adjuvantsystemer for å forsterke immunogenisiteten av formuleringen som er kjent for fagpersonene. Doseringen vil avhenge av den spesifikke aktiviteten av vaksinen og kan lett bli bestemt ved rutineeksperimentering.

I tillegg til andre referanser anført heri, er et mangfold av rense/proteinfoldingsmetoder kjent for fagpersonene, inkludert, men ikke begrenset til, de presentert i R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, *Methods in Enzymology* bind 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) *Protein Methods*, 2. utgave Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ, Harris og Angal, (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris og Angal, *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes, (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3. utgave Springer Verlag, NY; Janson og Ryden, (1998) *Protein Purification: Principles High Resolution Methods and Applications* andre utgave Wiley-VCH, NY; og Walker (1998), *Protein Protocols* på CD-ROM Humana Press, NJ; og referansene henvist til deri.

Én fordel ved produksjon av et interessant protein eller polypeptid med en unaturlig aminosyre i en eukaryotisk vertscelle eller ikke-eukaryotisk vertscelle er at proteinene eller polypeptidene typisk vil være foldet i deres naturlige konformasjoner. I visse utførelsesformer av oppfinnelsen, vil imidlertid de med kunnskap innen faget erkjenne at, etter syntese, ekspresjon og/eller rensing, kan proteiner eller peptider inneha en konformasjon forskjellig fra de ønskede konformasjonene av de relevante polypeptidene. I ett aspekt av redegjørelsen, blir det uttrykte proteinet eller polypeptidet eventuelt denaturert og så renaturert. Dette blir gjennomført ved å utnytte fremgangsmåter kjent innen faget, inkludert men ikke begrenset til, ved å tilsette et chaperonin til det

interessante proteinet eller polypeptidet, ved å solubilisere proteinene i et kaotropisk middel så som guanidin HCl, ved å utnytte proteindisulfidisomerase, etc.

Generelt, er det innimellom ønskelig å denaturere og redusere uttrykte polypeptider og deretter å forårsake at polypeptidene re-foldes til den foretrukne konformasjonen. For eksempel kan guanidin, urea, DTT, DTE og/eller et chaperonin bli tilsatt til et interessant 5 translasjonsprodukt. Fremgangsmåter for å redusere, denaturere og renaturere proteiner er kjent for fagpersonene (se, referansene over, og Debinski, et al. (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman og Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; og Buchner, et al., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270). Debinski, et al., beskriver for 10 eksempel, denatureringen og reduseringen av inklusjonslegemeproteiner i guanidin-DTE. Proteinene kan bli refoldet i en redoksbuffer inneholdende, inkludert men ikke begrenset til, oksidert glutation og L-arginin. Refoldingsreagenser kan bli strømmet eller på annen måte beveget til kontakt med det éne eller de flere polypeptid(ene) eller annet ekspresjonsprodukt, eller vice-versa.

I tilfellet av prokaryotisk produksjon av FGF-21 polypeptid, kan FGF-21 15 polypeptidet produsert slik bli feilfoldet og derfor mangle eller ha redusert biologisk aktivitet. Bioaktiviteten av proteinet kan bli gjendannet ved "refolding". Generelt, blir feilfoldet FGF-21 polypeptid refoldet ved solubilisering (hvor FGF-21 polypeptidet også er uløselig), utfolding og redusering av polypeptidkjeden ved anvendelse av, for 20 eksempel, ett eller flere kaotropiske midler (f.eks. urea og/eller guanidin) og et reduksjonsmiddel som er i stand til å redusere disulfidbindinger (f.eks. ditiotreitoll, DTT eller 2-merkaptoetanol, 2-ME). Ved en moderat konsentrasjon av kaotrop, blir et oksidasjonsmiddel så tilsatt (f.eks. oksygen, cystin eller cystamin), som tillater gjendannelsen av disulfidbindinger. FGF-21 polypeptid kan bli refoldet ved anvendelse av 25 standard fremgangsmåter kjent innen faget, så som de beskrevet i U.S. pat. nr. 4,511,502, 4,511,503 og 4,512,922. FGF-21 polypeptidet kan også be ko-foldet med andre proteiner for å danne heterodimerer eller heteromultimerer.

Etter refolding, kan FGF-21en bli videre rensed. Rensing av FGF-21 kan bli gjennomført ved anvendelse av et mangfold av teknikker kjent for fagpersonene, inkludert 30 hydrofob vekselvirkningskromatografi, størrelsesutelukkelseskromatografi, ionebyttekromatografi, omvendt-fase høytytelsesvæskeskromatografi, affinitetskromatografi og lignende eller en hvilken som helst kombinasjon derav. Ytterligere rensing kan også inkludere et trinn med tørking eller utfelling av det rensede proteinet.

Etter rensing, kan FGF-21 bli byttet i forskjellige buffere og/eller konsentrert ved 35 en hvilken som helst av et mangfold av fremgangsmåter kjent innen faget, inkludert, men ikke begrenset til, diafiltrering og dialyse. FGF-21 som er tilveiebrakt som et enkelt rensed protein kan bli utsatt for aggregering og utfelling.

Den rensede FGF-21 kan være minst 90 % ren (som målt ved omvendt fase høytytelsesvæskeskromatografi, RP-HPLC, eller natriumdodekylsulfat-polyakrylamid

gelelektroforese, SDS-PAGE) eller minst 95 % rent, eller minst 98 % rent, eller minst 99 % eller mer rent. Uavhengig av den eksakte numeriske verdien av renheten av FGF-21en, er FGF-21en tilstrekkelig ren for bruk som et farmasøytisk produkt eller for videre prosessering, så som konjugering med en vannløselig polymer så som PEG.

5 Visse FGF-21 molekyler kan bli brukt som terapeutiske midler i fraværet av andre aktive ingredienser eller proteiner (andre enn eksipienser, bærere, og stabilisatorer, serumalbumin og lignende), eller de kan bli kompleksert med et annet protein eller en polymer.

10 Generelle rensemetoder Et hvilket som helst av et mangfold av isoleringstrinnene kan bli utført på cellelysate, ekstrakten, kulturmediet, inklusjonslegemene, periplasmiske rommet av vertscellene, cytoplasmaet av vertscellene, eller annet materiale, omfattende FGF-21 polypeptid eller på hvilke som helst FGF-21 polypeptidblandinger som resulterer fra hvilke som helst isoleringstrinn inkludert, men ikke begrenset til, affinitetskromato-  
15 grafi, ionebyttekromatografi, hydrofob vekselvirkningskromatografi, gelfiltreringskromatografi, høytytelsesvæskrokromatografi ("HPLC"), omvendt fase-HPLC ("RP-HPLC"), eksplandert sjikt adsorpsjon, eller en hvilken som helst kombinasjon og/eller repetisjon derav og i en hvilken som helst passende rekkefølge.

Utstyr og andre nødvendige materialer brukt for å utføre teknikkene beskrevet heri  
20 er kommersielt tilgjengelige. Pumper, fraksjonssamlere, monitorer, registreringsapparater og hele systemer er tilgjengelige fra, for eksempel, Applied Biosystems (Foster City, CA), BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) og Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, NJ). Kromatografiske materialer inkludert, men ikke begrenset til, bytematriksmaterialer, medier og buffere er også tilgjengelige fra slike selskaper.

25 Innstilling av likevekt, og andre trinn i kolonnekromatografiprosessene beskrevet heri så som vasking og eluering, kan bli hurtigere gjennomført ved anvendelse av spesialisert utstyr så som en pumpe. Kommersielt tilgjengelige pumper inkluderer, men er ikke begrenset til, HILOAD<sup>®</sup> pumpe P-50, peristaltisk pumpe P-1, pumpe P-901 og pumpe P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

30 Eksempler på fraksjonssamlere inkluderer RediFrac fraksjonssamler, FRAC-100 og FRAC-200 fraksjonssamlere, og SUPERFRAC<sup>®</sup> fraksjonssamler (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Miksere er også tilgjengelige for å danne pH- og lineære konsentrasjonsgradienter. Kommersielt tilgjengelige miksere inkluderer gradientmikser GM-1 og In-Line miksere (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

35 Den kromatografiske prosessen kan bli overvåket ved anvendelse av en hvilken som helst kommersielt tilgjengelig monitor. Slike monitorer kan bli brukt for å samle informasjon slik som UV, pH og konduktivitet. Eksempler på detektorer inkluderer Monitor UV-1, UVICORDO S II, Monitor UV-M II, Monitor UV-900, Monitor UPC-900, Monitor pH/C-900 og konduktivitetsmonitor (Amersham Biosciences, Piscataway,



NJ). Faktisk er hele systemer kommersielt tilgjengelig, inkludert de ulike AKTA® systemene fra Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

I én utførelsesform av foreliggende redegjørelse, for eksempel, kan FGF-21 polypeptidet bli redusert og denaturert ved først å denaturere det resulterende rensede FGF-21 polypeptidet i urea, fulgt av fortynning i TRIS buffer inneholdende et reduksjonsmiddel (slik som DTT) ved en egnet pH. I en annen utførelsesform av redegjørelsen, blir FGF-21 polypeptidet denaturert i urea i et konsentrasjonsområde på mellom omkring 2 M til omkring 9 M, fulgt av fortynning i TRIS buffer ved en pH i området fra omkring 5,0 til omkring 8,0. Refoldingsblandingen ifølge denne utførelsesformen kan så bli inkubert. I én utførelsesform av redegjørelsen, blir refoldingsblandingen inkubert ved romtemperatur i fire til tjue-fire timer. Den reduserte og denaturerte FGF-21 polypeptidblandingen kan så bli videre isolert eller rensat.

Som fastslått heri, kan pH-en i den første FGF-21 polypeptidblandingen bli regulert før en utfører hvilke som helst påfølgende isoleringstrinn. I tillegg, kan den første FGF-21 polypeptidblandingen eller en hvilken som helst påfølgende blanding derav bli konsentrert ved anvendelse av teknikker kjent innen faget. Dessuten, kan en elueringsbuffer omfattende den første FGF-21 polypeptidblandingen eller en hvilken som helst påfølgende blanding derav bli byttet for en buffer egnet for det neste isoleringstrinnet ved anvendelse av teknikker kjent for fagpersonene.

Ionebyttekromatografi I én utførelsesform, og som et valgfritt, ytterligere trinn, kan ionebytte-kromatografi bli utført på den første FGF-21 polypeptidblandingen. *Se generelt ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS* (Kat. nr. 18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Kommerisielt tilgjengelige ionebyttekolonner inkluderer HITRAP®, HIPREP® og HILOAD® Kolonner (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Slike kolonner utnytter sterke anionbyttere så som Q SEPHAROSE® Fast Flow, Q SEPHAROSE® High Performance, og Q SEPHAROSE® XL; sterke kationbyttere så som SP SEPHAROSE® High Performance, SP SEPHAROSE® Fast Flow og SP SEPHAROSE® XL; svake anionbyttere så som DEAE SEPHAROSE® Fast Flow; og svake kationbyttere så som CM SEPHAROSE® Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Anion- eller kationbyttekolonnekromatografi kan bli utført på FGF-21 polypeptidet ved et hvilket som helst trinn av renseprosessen for å isolere hovedsakelig rensat FGF-21 polypeptid. Kationbyttekromatografietrinn kan bli utført ved anvendelse av en hvilken som helst egnet kationbyttetriks. Nyttige kationbyttetriks inkluderer, men er ikke begrenset til, fibrøse, porøse, ikke-porøse, mikrogranulære, perleformede eller kryssbundne kationbyttetriksmaterialer. Slike kationbyttetriksmaterialer inkluderer, men er ikke begrenset til, cellulose, agarose, dekstran, polyakrylat, polyvinyl, polystyren, silika, polyeter eller kompositter av hvilke som helst av de foregående.

Kationbyttetriksen kan være en hvilken som helst egnet kationbytter inkludert sterke og svake kationbyttere. Sterke kationbyttere kan forbli ionisert over et bredt pH-område og kan derfor være i stand til å binde FGF-21 over et bredt pH-område. Svake kationbyttere, kan imidlertid tape ionisering som en funksjon av pH. For eksempel kan en svak kationbytter tape ladning når pH-en faller under omkring pH 4 eller pH 5. Egnede sterke kationbyttere inkluderer, men er ikke begrenset til, ladede funksjonelle grupper så som sulfopropyl (SP), metylsulfonat (S) eller sulfoetyl (SE). Kationbyttetriksen kan være en sterk kationbytter, som fortrinnsvis har et FGF-21 bindende pH-område på omkring 2,5 til omkring 6,0. Alternativt kan den sterke kationbyttieren ha et FGF-21 bindende pH-område på omkring pH 2,5 til omkring pH 5,5. Kationbyttetriksen kan være en sterk kationbytter som har en FGF-21 bindende pH på omkring 3,0. Alternativt kan kationbyttetriksen være en sterk kationbytter, som fortrinnsvis har et FGF-21 bindende pH-område fra omkring 6,0 til omkring 8,0. Kationbyttetriksen kan være en sterk kationbytter som fortrinnsvis har et FGF-21 bindende pH-område fra omkring 8,0 til omkring 12,5. Alternativt kan den sterke kationbyttieren ha et FGF-21 bindende pH-område fra omkring pH 8,0 til omkring pH 12,0.

Før forsyning av FGF-21en, kan kationbyttetriksen bli brakt til likevekt, for eksempel, ved anvendelse av mange kolonnevolumer av en fortynnet, svak syre, f.eks. fire kolonnevolumer av 20 mM eddiksyre, pH 3. Etter innstilling av likevekt, kan FGF-21en bli tilsatt og kolonnen kan bli vasket én til mange ganger, før eluering av hovedsakelig rensset FGF-21, også ved anvendelse av en svak syreløsning så som en svak eddiksyre- eller fosforsyreløsning. For eksempel kan omtrent 2-4 kolonnevolumer av 20 mM eddiksyre, pH 3 bli brukt for å vaske kolonnen. Ytterligere vasker ved anvendelse av, f.eks. 2-4 kolonnevolumer av 0,05 M natriumacetat, pH 5,5, eller 0,05 M natriumacetat blandet med 0,1 M natriumklorid, pH 5,5, kan også bli brukt. Alternativt, ved anvendelse av fremgangsmåter kjent innen faget, kan kationbyttetriksen bli brakt til likevekt ved anvendelse av mange kolonnevolumer av en fortynnet, svak base.

Alternativt kan hovedsakelig rensset FGF-21 bli eluert ved å bringe kationbyttetriksen i kontakt med en buffer som har en tilstrekkelig lav pH eller ionestyrke til å forskyve FGF-21en fra matriksen. pH-en for elueringsbufferen kan spenne fra omkring pH 2,5 til omkring pH 6,0. Mer spesifikt, kan pH-en for elueringsbufferen spenne fra omkring pH 2,5 til omkring pH 5,5, omkring pH 2,5 til omkring pH 5,0. Elueringsbufferen kan ha en pH på omkring 3,0. I tillegg kan mengden av elueringsbuffer variere vidt og vil generelt være i området fra omkring 2 til omkring 10 kolonnevolumer.

Etter adsorpsjon av FGF-21 polypeptidet til kationbyttetriksen, kan hovedsakelig rensset FGF-21 polypeptid bli eluert ved å bringe matriksen i kontakt med en buffer som har en tilstrekkelig høy pH eller ionestyrke til å forskyve FGF-21 polypeptidet fra matriksen. Egnede buffere for bruk i høy-pH-eluering av hovedsakelig rensset FGF-21 polypeptid kan inkludere, men ikke begrenset til, citrat-, fosfat-, format-, acetat-, HEPES-

og MES-buffere som spenner i konsentrasjon fra minst omkring 5 mM til minst omkring 100 mM.

Omvendt-fase kromatografi RP-HPLC kan bli utført for å rense proteiner ved å følge egnede protokoller som er kjent for fagpersonene. *Se, f.eks.* Pearson et al., ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982); Rivier et al., J. CHROM. (1983) 268:112-119; Kunitani et al., J. CHROM. (1986) 359:391-402. RP-HPLC kan bli utført på FGF-21 polypeptidet for å isolere hovedsakelig rensset FGF-21 polypeptid. I denne sammenhengen, kan det bli brukt silikaderivatiserte harpikser med alkylfunksjonaliteter med en lang rekke lengder, inkludert, men ikke begrenset til, minst omkring C<sub>3</sub> til minst omkring C<sub>30</sub>, minst omkring C<sub>3</sub> til minst omkring C<sub>20</sub>, eller minst omkring C<sub>3</sub> til minst omkring C<sub>18</sub>, harpikser. Alternativt kan det bli brukt en polymerharpiks. For eksempel, kan TosoHaas Amberchrome CG1000sd harpiks bli brukt, som er en styrenpolymerharpiks. Cyano eller polymere harpikser med en lang rekke alkylkjedelengder kan også be brukt. Dessuten kan RP-HPLC kolonnen bli vasket med et løsemiddel så som etanol. Source RP kolonnen er et annet eksempel på en RP-HPLC kolonne.

En egnet elueringsbuffer inneholdende et ioneparingsmiddel og en organisk modifikator så som metanol, isopropanol, tetrahydrofuran, acetonitril eller etanol, kan bli brukt for å eluere FGF-21 polypeptidet fra RP-HPLC kolonnen. De vanligst brukte ioneparingsmidlene inkluderer, men er ikke begrenset til, eddiksyre, maursyre, perklorsyre, fosforsyre, trifluoreddiksyre, heptafluorsmørsyre, trietylamin, tetrametyl-ammonium, tetrabutylammonium og trietylammونیumacetat. Eluering kan bli utført ved anvendelse av én eller flere gradienter eller isokratiske betingelser, med gradient-betingelser foretrukket for å redusere separasjonstid og redusere toppbredde. En annen fremgangsmåte involverer anvendelsen av to gradienter med forskjellige løsemiddel-konsentrasjonsområder. Eksempler på egnede elueringsbuffere for bruk heri kan inkludere, men er ikke begrenset til, ammoniumacetat og acetonitrilløsninger.

Hydrofob vekselvirkningskromatografi renseteknikker Hydrofob vekselvirkningskromatografi (HIC) kan bli utført på FGF-21 polypeptidet. *Se generelt* HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS (Kat. nr. 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Egnede HIC matrikser kan inkludere, men er ikke begrenset til, alkyl- eller aryl-substituerte matrikser, så som butyl-, heksyl-, oktyl- eller fenylsubstituerte matrikser inkludert agarose, kryssbunden agarose, sefarse, cellulose, silika, dekstran, polystyren, poly(metakrylat)-matrikser, og blandet modus harpikser, inkludert men ikke begrenset til, en polyetylenaminharpiks eller en butyl- eller fenyl-substituert poly(metakrylat)matriks. Kommersielt tilgjengelige kilder for hydrofob vekselvirkningskolonnekromatografi inkluderer, men er



minst omkring 93 %, minst omkring 94 %, minst omkring 95 %, minst omkring 96 %, minst omkring 97 %, minst omkring 98 %, minst omkring 99 %, minst omkring 99,9 % eller minst omkring 99,99 %, av FGF-21en i utgangsmaterialet for hvert rensetrinn.

Renhet kan bli bestemt ved anvendelse av standardteknikker, så som SDS-PAGE, eller ved å måle FGF-21 polypeptid ved anvendelse av Western blot og ELISA undersøkelser. For eksempel kan det bli generert polyklonale antistoffer overfor proteiner isolert fra negativ kontroll gjærfermentering og kationbyttegjenvinningen. Antistoffene kan også bli brukt for å teste for nærværet av forurensende vertscelleproteiner.

RP-HPLC materiale Vydac C4 (Vydac) består av silikagelpartikler, overflatene av disse bærer C4-alkylkjeder. Separasjonen av FGF-21 polypeptid fra de proteinholdige urenheterne er basert på forskjeller i styrken av hydrofobe vekselvirkninger. Eluering blir utført med en acetonitrilgradient i fortynnet trifluoreddiksyre. Preparativ HPLC blir utført ved anvendelse av en rustfri stålkolonne (fylt med 2,8 til 3,2 liter Vydac C4 silikagel). Hydroksyapatitt Ultrogel eluatet blir surgjort ved tilsetning av trifluoreddiksyre og beladet på Vydac C4 kolonnen. For vasking og eluering blir det brukt en acetonitrilgradient i fortynnet trifluoreddiksyre. Fraksjoner blir samlet og umiddelbart nøytralisert med fosfatbuffer. FGF-21 polypeptidfraksjonene som er innen IPC grensene blir samlet.

DEAE Sefarose (Pharmacia) materiale består av dietyl aminoetyl (DEAE)-grupper som er kovalent bundet til overflaten av Sefarose-kuler. Bindingen av FGF-21 polypeptid til DEAE gruppene blir mediert ved ioniske vekselvirkninger. Acetonitril og trifluoreddiksyre passerer gjennom kolonnen uten å bli holdt tilbake. Etter at disse substansene har blitt vasket av, blir sporurenheter fjernet ved å vaske kolonnen med acetatbuffer ved en lav pH. Så blir kolonnen vasket med nøytral fosfatbuffer og FGF-21 polypeptid blir eluert med en buffer med øket ionestyrke. Kolonnen blir pakket med DEAE Sefarose fast flow. Kolonnevolumet blir regulert for å sikre en FGF-21 polypeptid-belastning i området fra 3-10 mg FGF-21 polypeptid/ml gel. Kolonnen blir vasket med vann og likevektsinnstillingsbuffer (natrium/kaliumfosfat). De samlede fraksjonene av HPLC eluatet blir fylt og kolonnen blir vasket med likevektsinnstillingsbuffer. Så blir kolonnen vasket med vaskebuffer (natriumacetatbuffer) fulgt av vasking med likevektinnstillingsbuffer. Deretter blir FGF-21 polypeptid eluert fra kolonnen med elueringsbuffer (natriumklorid, natrium/kaliumfosfat) og samlet i en enkelt fraksjon i samsvar med den styrende elueringsprofilen. Eluatet fra DEAE Sefarose kolonnen blir regulert til den spesifiserte konduktiviteten. Den resulterende legemiddelsubstansen blir sterilfiltrert til teflonflasker og lagret ved -70 °C.

Ytterligere fremgangsmåter som kan bli anvendt inkluderer, men er ikke begrenset til, trinnene for å fjerne endotoksiner. Endotoksiner er lipopolysakkarider (LPSer) som er lokalisert på den ytre membranen av Gram-negative vertsceller, slik som, for eksempel, Escherichia coli. Fremgangsmåter for å redusere endotoksinnivåer er kjent for en fagperson og inkluderer, men er ikke begrenset til, renseteknikker ved anvendelse av

silikabærere, glasspulver eller hydrokapatitt, omvendt-fase, affinitets-, størrelses-  
utelukkelses-, anionbyttekromatografi, hydrofob vekselvirkningskromatografi, en  
kombinasjon av disse fremgangsmåtene og lignende. Modifikasjoner eller ytterligere  
fremgangsmåter kan bli krevet for å fjerne forurensninger så som ko-migrerende proteiner  
5 fra det interessante polypeptidet. Fremgangsmåter for å måle endotoksinnivåer er kjent for  
en fagperson og inkluderer, men er ikke begrenset til, Limulus Amebocyt Lysat (LAL)  
undersøkelser. Endosafe™-PTS analysen er et kolorimetrisk, enkeltrørsystem som utnytter  
patroner forhåndsbeladet med LAL reagens, kromogent substrat, og kontroll standard  
endotoksin sammen med et håndholdt spektrofotometer. Alternative fremgangsmåter  
10 inkluderer, men er ikke begrenset til, en kinetisk LAL metode som er turbidimetrisk og  
bruker et 96 brønn format.

Et vidt mangfold av fremgangsmåter og prosedyrer kan bli brukt for å vurdere  
utbyttet og renheten av et FGF-21 protein omfattende én eller flere ikke-naturlig kodede  
aminosyrer, inkludert men ikke begrenset til, Bradford analysen, SDS-PAGE, sølvfarget  
15 SDS-PAGE, coomassie-farget SDS-PAGE, massespektrometri (inkludert men ikke  
begrenset til, MALDI-TOF) og andre metoder for å karakterisere proteiner kjent for en  
fagperson.

Ytterligere fremgangsmåter inkluderer, men er ikke begrenset til: SDS-PAGE  
koplet med proteinfargingsmetoder, immunoblotting, matriksassistert laserdesorpsjon/-  
20 ionisering-massespektrometri (MALDI-MS), væskekromatografi/massespektrometri,  
isoelektrisk fokusering, analytisk anionbytting, kromatofokusering og sirkulær dikroisme.

### ***VIII. Ekspresjon i alternative systemer***

Flere strategier har blitt anvendt for å introdusere unaturlige aminosyrer i proteiner  
25 i ikke-rekombinante vertsceller, mutageniserte vertsceller eller i celle-frie systemer. Disse  
systemene er også egnet for bruk i tilvirkning av FGF-21 polypeptidene ifølge fore-  
liggende oppfinnelse. Derivatisering av aminosyrer med reaktive side-kjeder så som Lys,  
Cys og Tyr resulterte i omformingen av lysin til N<sup>2</sup>-acetyl-lysin. Kjemisk syntese  
tilveiebringer også en ukomplisert fremgangsmåte for å inkorporere unaturlige  
30 aminosyrer. Med den nyere utviklingen av enzymatisk ligasjon og naturlig kjemisk  
ligasjon av peptidfragmenter, er det mulig å lage større proteiner. *Se, f.eks.* P. E. Dawson  
og S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem*, 69:923 (2000). Kjemisk peptidligasjon og naturlig  
kjemisk ligasjon er beskrevet i U.S. patent nr. 6,184,344, U.S. patentpublikasjon nr.  
2004/0138412, U.S. patentpublikasjon nr. 2003/0208046, WO 02/098902 og WO  
35 03/042235. En generell in vitro biosyntetisk fremgangsmåte hvor et suppressor tRNA  
kjemisk acylert med den ønskede unaturlige aminosyren blir tilsatt til en in vitro ekstrakt  
som er i stand til å støtte proteinbiosyntese, har blitt brukt for å sete-spesifikt inkorporere  
over 100 unaturlige aminosyrer i et mangfold av proteiner av praktisk talt en hvilken som  
helst størrelse. *Se, f.eks.* V. W. Cornish, D. Mendel og P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int.*

Ed. Engl., 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science* 244:182-188 (1989); og J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Dimala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 111:8013-8014 (1989). Et vidt område av funksjonelle grupper har blitt introdusert til proteiner for studier av proteinestabilitet, proteinfolding, enzymmekanisme og signaltransduksjon.

En *in vivo* fremgangsmåte, betegnet seleksjonstrykk inkorporering, ble utviklet for å nyttiggjøre promiskuiteten til vill-type syntetaser. *Se, f.eks.* N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder og R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999). En auxotrofisk stamme, hvor den relevante metabolske veien som forsyner cellen med en spesiell naturlig aminosyre er stengt av, blir dyrket i minimale medier inneholdende begrensede konsentrasjoner av den naturlige aminosyren, mens transkripsjon av målgenet blir holdt nede. Ved begynnelsen av en stasjonær vekstfase, er den naturlige aminosyren utarmet og erstattet med den unaturlige aminosyreanalogen. Induksjon av ekspresjon av det rekombinante proteinet resulterer i akkumuleringen av et protein inneholdende den unaturlige analogen. For eksempel, ved anvendelse av denne strategien, har o, m og p-fluorfenylalaniner blitt inkorporert i proteiner, og utviser to karakteristiske skuldre i UV spekteret som enkelt kan bli identifisert, *se, f.eks.* C. Minks, R. Huber, L. Moroder og N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000); trifluormetionin har blitt brukt for å erstatte metionin i bakteriofag T4 lysozym for å studere dets vekselvirkning med kitoologosakkaridligander ved <sup>19</sup>F NMR, *se, f.eks.* H. Duetzel, E. Daub, V. Robinson og J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997); og trifluorleucin har blitt inkorporert istedenfor leucin, noe som resulterer i øket termisk og kjemisk stabilitet av et leucin-zipperprotein. *Se, f.eks.* Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado og D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001). Dessuten blir selenometionin og tellurometionin inkorporert i ulike rekombinante proteiner for å legge til rette for løsningen av faser i røntgenkrystallografi. *Se, f.eks.* W. A. Hendrickson, J. R. Horton og D. M. Lemaster, *EMBO J.*, 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda og M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskom, J. Kellermann og R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); og N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder og R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997). Metioninanaloger med alken- eller alkynfunksjonaliteter har også blitt inkorporert effektivt, noe som sørger for ytterligere modifikasjon av proteiner ved kjemiske metoder. *Se, f.eks.* J. C. van Hest og D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 428:68 (1998); J. C. van Hest, K. L. Kiick og D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 122:1282 (2000); og K. L. Kiick og D. A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56:9487 (2000); U.S. patent nr. 6,586,207; U.S. patentpublikasjon 2002/0042097.

Suksessen for denne fremgangsmåten avhenger av gjenkjennelsen av de unaturlige aminosyreanalogene ved aminoacyl-tRNA syntetaser, som, generelt, krever høy selektivitet for å sikre påliteligheten av proteintranslasjon. Én måte å ekspandere omfanget av denne fremgangsmåten på er å slakke på substratspesifisiteten av aminoacyl-tRNA syntetaser, som har blitt oppnådd i et begrenset antall av tilfeller. For eksempel, øker erstatning av Ala<sup>294</sup> ved Gly i *Escherichia coli* fenylalanyl-tRNA syntetase (PheRS) størrelsen av substratbindende fordypning, og resulterer i acyleringen av tRNAPhe ved p-Cl-fenylalanin (p-Cl-Phe). Se, M. Ibba, P. Kast og H. Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994). En *Escherichia coli* stamme som huser denne mutante PheRS tillater inkorporeringen av p-Cl-fenylalanin eller p-Br-fenylalanin istedenfor fenylalanin. Se, f.eks. M. Ibba og H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364:272 (1995); og, N. Sharma, R. Furter, P. Kast og D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467:37 (2000). På lignende måte, ble en punktmutasjon Phe130Ser nær aminosyrebindingssetet av *Escherichia coli* tyrosyl-tRNA syntetase vist å tillate at azatyrosin blir inkorporert mer effektivt enn tyrosin. Se, F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll og S. Nishimura, *J. Biol. Chem.*, 275:40324 (2000).

En annen strategi for å inkorporere unaturlige aminosyrer i proteiner in vivo er å modifisere syntetaser som har korrekturlesingsmekanismer. Disse syntetasene kan ikke differensiere og aktiverer derfor aminosyrer som er strukturelt lignende til de beslektede naturlige aminosyrene. Denne feilen blir korrigeret ved et separat sete, som deacylerer den feilladede aminosyren fra tRNAet for å opprettholde påliteligheten av proteintranslasjon. Hvis korrekturlesingsaktiviteten av syntetasen blir gjort uvirksom, kan strukturelle analoger som er feilaktivert unnslippe redigeringsfunksjonen og bli inkorporert. Denne tilnærmelsen har blitt bevist i det siste med valyl-tRNA syntetasen (ValRS). Se, V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel og P. Marliere, *Science*, 292:501 (2001). ValRS kan feilaminoacylere tRNAVal med Cys, Thr eller aminobutytrat (Abu); disse ikke-beslektede aminosyrene blir deretter hydrolysert ved redigeringsdomenet. Etter tilfeldig mutagenese av *Escherichia coli* kromosomet, ble en mutant *Escherichia coli* stamme valgt som har en mutasjon i redigeringssetet av ValRS. Denne redigerings-ufullkomne ValRS lader feilaktig tRNAVal med Cys. Fordi Abu sterisk ligner Cys (-SH gruppe på Cys er erstattet med -CH<sub>3</sub> i Abu), inkorporerer den mutante ValRS også Abu inn i proteiner når denne mutante *Escherichia coli* stammen blir dyrket i nærvær av Abu. Massespektrometrisk analyse viser at omkring 24 % av valiner er erstattet ved Abu ved hver valinposisjon i det naturlige proteinet.

Fast-fase syntese og semisyntetiske fremgangsmåter har også sørget for syntesen av flere proteiner inneholdende nye aminosyrer. Se for eksempel, de følgende publikasjoner og referanser henvist til heri, som er som følger: Crick, F.H.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192:1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. Studies on polypeptides. XXXVI. The



effect of pyrazole-imidazol replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment, *J. Am chem*, 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enyzmes, *Acc Chem Res*, 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, *J Am Chem Soc*, 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease, *Science*, 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I.M. Semisynthetic peptides and proteins, *CRC Crit Rev Biochem*, 11(3):255-301 (1981); Offord, R.E. Protein engineering by chemical means? *Protein Eng.*, 1(3):151-157 (1987); og Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues, *Science*, 266(5183):243 (1994).

Kjemisk modifikasjon har blitt brukt for å introdusere et mangfold av unaturlige sidekjeder, inkludert kofaktorer, spinnmerker og oligonukleotider i proteiner in vitro. *Se, f.eks.* Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease, *Science*, 238(4832):1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S., Rokita, S.E. The chemical modification of enzymatic specificity, *Annu Rev Biochem*, 54:565-595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. Chemical mutation of enzyme active sites, *Science*, 226(4674):505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. Properties of thiol-subtilisin, *J Biol. Chem*, 243(24):6392-6401 (1968); Polgar, L. et M.L. Bender. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *J. Am Chem Soc*, 88:3153-3154 (1966); og Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, *Science*, 242(4881):1038-1040 (1988).

Alternativt, har biosyntetiske fremgangsmåter som anvender kjemisk modifiserte aminoacyl-tRNAer blitt brukt for å inkorporere flere biofysiske prober i proteiner syntetisert in vitro. Se de følgende publikasjoner og referanser henvist til heri: Brunner, J. New Photolabeling and crosslinking methods, *Annu. Rev Biochem*, 62:483-514 (1993); og Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 83(22):8604-8608 (1986).

Det har tidligere blitt vist at unaturlige aminosyrer kan bli sete-spesifikt inkorporert i proteiner in vitro ved tilsetningen av kjemisk aminoacylerte suppressor-tRNAer til proteinsyntesereaksjoner programmert med et gen inneholdende en ønsket amber-nonsense mutasjon. Ved anvendelse av disse tilnærmelsene, kan en substituere flere av de vanlige tjue aminosyrene med nære strukturelle homologer, f.eks. fluorfenylalanin for fenylalanin, ved anvendelse av stammer auxotrofiske for en spesiell aminosyre. *Se, f.eks.* Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*, 244: 182-188

(1989); M.W. Nowak, et al., *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa et al., *FASEB J.* 13:41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S.,  
 5 Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins, *Methods in Enz.*, bind 202, 301-336 (1992); og Mendel, D., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995).

For eksempel, ble det fremstilt et suppressor tRNA som gjenkjente stoppkodonet  
 10 UAG og ble kjemisk aminoacylert med en unaturlig aminosyre. Konvensjonell seterettet mutagenese ble brukt for å introdusere stoppkodonet TAG, ved det interessante setet i proteingenet. *Se, f.eks.* Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res*, 16(3):791-802 (1988). Når det acylerte suppressor tRNA og det mutante genet ble  
 15 kombinert i et in vitro transkripsjons/translasjonssystem, ble den unaturlige aminosyren inkorporert som svar på UAG kodonet som ga et protein inneholdende den aminosyren ved den spesifiserte posisjonen. Eksperimenter som bruker [<sup>3</sup>H]-Phe og eksperimenter med  $\alpha$ -hydroksysyrer beviste at bare den ønskede aminosyren blir inkorporert ved posisjonen spesifisert ved UAG kodonet og at denne aminosyren ikke blir inkorporert ved  
 20 noe annet sete i proteinet. *Se, f.eks.* Noren, et al, *supra*; Kobayashi et al., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432; og Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*, 255(5041):197-200 (1992).

Et tRNA kan bli aminoacylert med en ønsket aminosyre ved en hvilken som helst  
 25 fremgangsmåte eller teknikk, inkludert men ikke begrenset til, kjemisk eller enzymatisk aminoacylering.

Aminoacylering kan bli gjennomført ved aminoacyl tRNA syntetaser eller ved andre enzymatiske molekyler, inkludert men ikke begrenset til, ribozymmer. Begrepet "ribozym" er ensbetydende med "katalytisk RNA." Cech og medarbeidere (Cech, 1987,  
 30 *Science*, 236:1532-1539; McCorkle et al., 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226) beviste nærværet av naturlig forekommende RNAer som kan virke som katalysatorer (ribozymer). Selv om disse naturlige RNA katalysatorene bare har blitt vist å virke på ribonukleinsyresubstrater for spalting og spleising, har imidlertid den siste utviklingen av kunstig evolusjon av ribozymmer ekspandert repertoaret av katalyse til ulike kjemiske  
 35 reaksjoner. Studier har identifisert RNA molekyler som kan katalysere aminoacyl-RNA bindinger på deres egne (2')3'-termini (Illangakekare et al., 1995 *Science* 267:643-647), og et RNA molekyl som kan overføre en aminosyre fra ett RNA molekyl til et annet (Lohse et al., 1996, *Nature* 381:442-444).

U.S. patentsøknad publikasjon 2003/0228593 beskriver fremgangsmåter for å konstruere ribozymer og deres anvendelse i aminoacylering av tRNAer med naturlig kodede og ikke-naturlig kodede aminosyrer. Substrat-immobiliserte former av enzymatiske molekyler som kan aminoacylere tRNAer, inkludert men ikke begrenset til, ribozymer, kan muliggjøre effektiv affinitetsrensing av de aminoacylerte produktene. Eksempler på egnede substrater inkluderer agarose, sefarose og magnetiske kuler. Produksjonen og anvendelsen av en substrat-immobilisert form av ribozym for aminoacylering er beskrevet i Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084 og U.S. patentsøknad publikasjon 2003/0228593.

Kjemiske aminoacyleringsmetoder inkluderer, men er ikke begrenset til, de introdusert ved Hecht og medarbeidere (Hecht, S. M. Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem. 1978, 253, 4517) og av Schultz, Chamberlin, Dougherty og andre (Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013; Bain, J. D. et al. Nature 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Chem. Biol. 1997, 4, 740; Turcatti, et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. et al. Science, 1995, 268, 439; Saks, M. E. et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34) for å unngå anvendelsen av syntetaser i aminoacylering. Slike fremgangsmåter eller andre kjemiske aminoacyleringsmetoder kan bli brukt for å aminoacylere tRNA molekyler.

Fremgangsmåter for å generere katalytisk RNA kan involvere generering av separate pooler av randomiserte ribozymsekvenser, utføre styrt evolusjon på poolene, screene poolene for ønskelig aminoacyleringsaktivitet og velge sekvenser av de ribozymene som utviser ønsket aminoacyleringsaktivitet.

Ribozymer kan omfatte motiver og/eller regioner som legger til rette for acyleringsaktivitet, så som et GGU motiv og en U-rik region. For eksempel, har det blitt rapportert at U-rike regioner kan legge til rette for gjenkjennelse av et aminosyresubstrat, og et GGU-motiv kan danne basepar med 3' terminiene av et tRNA. I kombinasjon, legger GGU og motiv og den U-rike regionen til rette for samtidig gjenkjennelse av både aminosyren og tRNA samtidig, og legger derved til rette for aminoacylering av 3' terminusen av tRNA-et.

Ribozymer kan bli generert ved *in vitro* seleksjon ved anvendelse av en delvis randomisert r24mini konjugert med tRNA<sup>Asn</sup>CCCG, fulgt av systematisk snekring av en konsensussekvens funnet i de aktive klonene. Et eksempelvis ribozym oppnådd ved denne fremgangsmåten er betegnet "Fx3 ribozym" og er beskrevet i U.S. Pub. søkn. nr.

2003/0228593 virker som en allsidig katalysator for syntesen av ulike aminoacyl-tRNAer ladet med beslektede ikke-naturlige aminosyrer.

Immobilisering på et substrat kan bli brukt for å muliggjøre effektiv affinitetsrensing av de aminoacylerte tRNAene. Eksempler på egnede substrater inkluderer, men er ikke begrenset til, agarose, sefarose og magnetiske kuler. Ribozymmer kan bli immobilisert på harpikser ved å utnytte den kjemiske strukturen av RNA, så som at 3'-cis-diol på ribosen av RNA kan bli oksidert med perjodat for å gi det tilsvarende dialdehydet for å legge til rette for immobilisering av RNA-et på harpiksen. Ulike typer harpikser kan bli brukt inkludert rimelige hydrazidharpikser hvori reduktiv aminering gjør vekselvirkningen mellom harpiksen og ribozymet til en irreversibel binding. Syntese av aminoacyl-tRNAer kan bli betydelig fremmet ved denne "på-kolonne" aminoacyleringsteknikken. Kourouklis et al. *Methods* 2005; 36:239-4 beskriver et kolonne-basert aminoacyleringssystem.

Isolering av de aminoacylerte tRNAene kan bli gjennomført på et mangfold av måter. Én egnet fremgangsmåte er å eluere de aminoacylerte tRNAene fra en kolonne med en buffer så som en natriumacetatløsning med 10 mM EDTA, en buffer inneholdende 50 mM N-(2-hydroksyetyl)piperazin-N'-(3-propansulfonsyre), 12,5 mM KCl, pH 7,0, 10 mM EDTA, eller ganske enkelt et EDTA bufret vann (pH 7,0).

De aminoacylerte tRNAene kan bli tilsatt til translasjonsreaksjoner for å inkorporere aminosyren som tRNAet ble aminoacylert med i en valgt posisjon i et polypeptid fremstilt ved translasjonsreaksjonen. Eksempler på translasjonssystemer som de aminoacylerte tRNAene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli brukt i inkluderer, men er ikke begrenset til cellelysater. Cellelysater tilveiebringer reaksjonskomponenter nødvendige for in vitro translasjon av et polypeptid fra en tilført mRNA. Eksempler på slike reaksjonskomponenter inkluderer men er ikke begrenset til ribosomale proteiner, rRNA, aminosyrer, tRNAer, GTP, ATP, translasjonsinitierings- og elongeringsfaktorer og ytterligere faktorer assosiert med translasjon. I tillegg, kan translasjonssystemer være satsvise translasjoner eller kompartmentalisert translasjon. Satsvise translasjonssystemer kombinerer reaksjonskomponenter i et enkelt kammer mens kompartmentaliserte translasjonssystemer skiller translasjonsreaksjonskomponentene fra reaksjonsprodukter som kan inhibere translasjonseffektiviteten. Slike translasjonssystemer er tilgjengelige kommersielt.

Videre kan et koplet transkripsjons-/translasjonssystem bli brukt. Koplede transkripsjons-/translasjonssystemer sørger for både transkripsjon av et tilført DNA til et tilsvarende mRNA, som i sin tur blir translatert ved reaksjonskomponentene. Et eksempel på en kommersielt tilgjengelig koplet transkripsjon/translasjon er Rapid Translation systemet (RTS, Roche Inc.). Systemet inkluderer en blanding inneholdende E. coli lysat for å tilveiebringe translasjonelle komponenter så som ribosomer og translasjonsfaktorer. I tillegg, er en RNA polymerase inkludert for transkripsjonen av det tilførte DNA til et

mRNA templat for bruk i translasjon. RTS kan bruke kompartmentalisering av reaksjonskomponentene ved hjelp av en membran anbrakt mellom reaksjonskammere, inkludert et tilførsels-/avfallskammer og et transkripsjons-/translasjonskammer.

Aminoacylering av tRNA kan bli utført ved andre midler, inkludert men ikke  
5 begrenset til, transferaser, polymeraser, katalytiske antistoffer, multi-funksjonelle proteiner og lignende.

Stephan i Scientist 2005 Oct 10; sidene 30-33 beskriver ytterligere fremgangsmåter for å inkorporere ikke-naturlig kodede aminosyrer i proteiner. Lu et al. i Mol Cell. 2001 Okt;8(4):759-69 beskriver en fremgangsmåte hvor et protein blir kjemisk ligert til et  
10 syntetisk peptid inneholdende unaturlige aminosyrer (uttrykt proteinligasjon).

Mikroinjeksjonsteknikker har også blitt brukt for å inkorporere unaturlige aminosyrer i proteiner. *Se, f.eks.* M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty og H. A. Lester, Science, 268:439 (1995); og,  
15 D. A. Dougherty, Curr. Opin. Chem. Biol., 4:645 (2000). En xenopus oocyt ble ko-injisert med to RNA-typer laget in vitro: et mRNA som koder for målproteinet med et UAG stoppkodon ved den interessante aminosyreposisjonen og et amber-suppressor tRNA aminoacylert med den ønskede unaturlige aminosyren. Det translasjonelle maskineri av oocytten setter så inn den unaturlige aminosyren ved posisjonen spesifisert  
20 ved UAG. Denne fremgangsmåten har tillatt in vivo struktur-funksjonstudier av udelte membranproteiner, som generelt ikke kan endres på in vitro ekspresjonssystemer. Eksempler inkluderer inkorporeringen av en fluorescent aminosyre i takykinin nevrokinin-2 reseptor for å måle avstander ved fluorescensresonansenergioverføring, se, f.eks. G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J.  
25 Knowles, H. Vogel og A. Chollet, J. Biol. Chem., 271:19991 (1996); inkorporeringen av biotinylerede aminosyrer for å identifisere overflate-eksponerte rester i ionekanaler, se, f.eks. J. P. Gallivan, H. A. Lester og D. A. Dougherty, Chem. Biol., 4:739 (1997); anvendelsen av fotoaktiverede tyrosinanaloger for å overvåke konformasjonsmessige forandringer i en ionekanal i sanntid, se, f.eks. J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M.  
30 England, D. A. Dougherty og H. A. Lester, Neuron, 20:619 (1998); og, anvendelsen av alfa-hydroksyaminosyrer for å forandre ionekanalryggrader for å teste deres portmekanismer. *Se, f.eks.* P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty og H. A. Lester, Cell, 96:89 (1999); og, T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz og J. Yang, Nat. Neurosci., 4:239 (2001).

35 Evnen til å inkorporere unaturlige aminosyrer direkte i proteiner in vivo tilbyr en lang rekke fordeler inkludert men ikke begrenset til, høye utbytter av mutante proteiner, teknisk letthet, potensialet til å studere de mutante proteinene i celler eller muligens i levende organismer og anvendelsen av disse mutante proteinene i terapeutiske behandlinger og diagnostiske anvendelser. Evnen til å inkludere unaturlige aminosyrer

med ulike størrelser, surheter, nukleofilisiteter, hydrofobisiteter og andre egenskaper i proteiner kan i høy grad ekspandere vår evne til å rasjonelt og systematisk manipulere strukturene av proteiner, både for å teste proteinfunksjon og danne nye proteiner eller organismer med nye egenskaper.

5 I et forsøk på å sete-spesifikt inkorporere para-F-Phe, ble det brukt et gjær-amber-suppressor tRNAPheCUA /fenylalanyl-tRNA syntetasepar i en p-F-Phe resistent, Phe auxotrofisk *Escherichia coli* stamme. *Se, f.eks.* R. Furter, Protein Sci., 7:419 (1998).

Det kan også være mulig å oppnå ekspresjon av et FGF-21 polynukleotid ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelse av et celle-fritt (in-vitro) translasjonelt system.

10 Translasjonssystemer kan være cellulære eller celle-frie, og kan være prokaryotiske eller eukaryotiske. Cellulære translasjonssystemer inkluderer, men er ikke begrenset til, hele cellepreparater så som permeabiliserte celler eller cellekulturer hvori en ønsket nukleinsyresekvens kan bli transkribert til mRNA og mRNAet translatert. Celle-frie translasjonssystemer er kommersielt tilgjengelige og mange forskjellige typer og systemer er velkjent. Eksempler på celle-frie systemer inkluderer, men er ikke begrenset til, 15 prokaryotiske lysater så som *Escherichia coli* lysater, og eukaryotiske lysater så som hvetekimekstrakter, insektcellelysater, kanin reticulocyttylsater, kanin oocyttylsater og humane cellelysater. Eukaryotiske ekstrakter eller lysater kan være foretrukket når det resulterende proteinet blir glykosylert, fosforylert eller på annen måte modifisert fordi 20 mange slike modifikasjoner bare er mulige i eukaryotiske systemer. Noen av disse ekstraktene og lysatene er tilgjengelige kommersielt (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y.). Membranøse ekstrakter, så som hunde-bukspyttkjertelekstraktene inneholdende mikrosomale membraner, er også tilgjengelige som er nyttige for å 25 translaterer sekretoriske proteiner. I disse systemene, som kan inkludere enten mRNA som et templat (in-vitro translasjon) eller DNA som et templat (kombinert in-vitro transkripsjon og translasjon), blir in vitro syntesen styrt ved ribosomene. Betydelig innsats har blitt utøvet for utviklingen av celle-frie proteinekspresjonssystemer. *Se, f.eks.* Kim, D.M. og J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 74 :309-316 (2001); Kim, D.M. og J.R. Swartz, Biotechnology Letters, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., og J.R. Swartz, Biotechnology Progress, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M., og J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 66, 180-188, (1999); og Patnaik, R. og J.R. Swartz, Biotechniques 24, 862-868, (1998); U.S. patent nr. 6,337,191; U.S. patentpublikasjon nr. 2002/0081660; WO 00/55353; WO 90/05785. En annen tilnærmselse som kan bli anvendt 35 for ekspresjonen av FGF-21 polypeptider omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre inkluderer mRNA-peptid-fusjonsteknikken. *Se, f.eks.* R. Roberts og J. Szostak, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, et al., Chemistry & Biology 10:1043-1050 (2003). I denne tilnærmselsen, blir et mRNA templat knyttet til puromycin translatert inn i peptid på ribosomet. Hvis én eller flere tRNA molekyler har blitt

modifisert, kan ikke-naturlige aminosyrer likeledes bli inkorporert inn i peptidet. Etter at det siste mRNA kodonet har blitt lest, fanger puromycin C-terminusen av peptidet. Hvis det resulterende mRNA-peptidkonjugatet blir funnet å ha interessante egenskaper i en in vitro analyse, kan dets identitet enkelt bli avslørt fra mRNA sekvensen. På denne måten, kan en screene biblioteker av FGF-21 polypeptider omfattende én eller flere ikke-naturlig kodede aminosyrer for å identifisere polypeptider som har ønskede egenskaper. Nyligere har in vitro ribosomtranslasjoner med rensede komponenter blitt rapportert som tillater syntesen av peptider substituert med ikke-naturlig kodede aminosyrer. *Se, f.eks.* A. Forster et al., Proc. Natl Acad Sci. (USA) 100:6353 (2003).

Rekonstituerte translasjonssystemer kan også bli brukt. Blandinger av rensede translasjonsfaktorer har også blitt brukt vellykket for å translatere mRNA til protein så vel som kombinasjoner av lysater eller lysater supplementert med rensede translasjonsfaktorer så som initieringsfaktor-1 (IF-1), IF-2, IF-3 ( $\alpha$  eller  $\beta$ ), elongeringsfaktor T (EF-Tu), eller termineringsfaktorer. Celle-frie systemer kan også være koplede transkripsjons/translasjonssystemer hvori DNA blir introdusert til systemet, transkribert til mRNA og mRNAet translatert som beskrevet i Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al. redaktører, Wiley Interscience, 1993). RNA transkribert i eukaryotisk transkripsjonssystem kan være i form av heteronukleær RNA (hnRNA) eller 5'-ende caps (7-metylguanodin) og 3'-ende poly A-halet modent mRNA, som kan være en fordel i visse translasjonssystemer. For eksempel, blir endede mRNAs translatert med høy effektivitet i reticulocyt-lysatsystemet.

### ***IX. Makromolekylære polymerer koplet til FGF-21 polypeptider***

Ulike modifikasjoner til de ikke-naturlig aminosyre polypeptidene beskrevet heri kan bli bevirket ved anvendelse av sammensetningene, fremgangsmåtene, teknikkene og strategiene beskrevet heri. Disse modifikasjonene inkluderer inkorporeringen av ytterligere funksjonalitet på ikke-naturlig aminosyrekomponenten av polypeptidet, inkludert men ikke begrenset til, et merke; et fargestoff; en polymer; en vann-løselig polymer; et derivat av polyetylen glykol; en fotokryssbinder; et radionuklid; en cytotoxisk forbindelse; et legemiddel; et affinitetsmerke; et fotoaffinitetsmerke; en reaktiv forbindelse; en harpiks; et andre protein eller polypeptid eller polypeptid analog; et antistoff eller antistofffragment; en metall-kompleksdanner; en kofaktor; en fettsyre; et karbohydrat; et polynukleotid; et DNA; et RNA; et antisense polynukleotid; et sakkarid; en vann-løselig dendrimer; et syklodekstrin; en inhiberende ribonukleinsyre; et biomateriale; en nanopartikkel; et spinnmerke; en fluorofor, en metall-holdig andel; en radioaktiv andel; en ny funksjonell gruppe; en gruppe som kovalent eller ikke-kovalent vekselvirker med andre molekyler; en fotoaktiverbar andel; en aktinisk strålingseksiterbar andel; en fotoisomeriserbar andel; biotin; et derivat av biotin; en biotin analog; en andel som inkorporerer et tungt atom; en kjemisk spaltbar gruppe; en fotospaltbar gruppe; en

forlenget sidekjede; et karbon-tilknyttet sukker; et redoks-aktivt middel; en amino-tiosyre; en toksisk andel; en isotopisk merket andel; en biofysisk probe; en fosforescent gruppe; en kjemiluminescent gruppe; en elektrontett gruppe; en magnetisk gruppe; en innskytende gruppe; en kromofor; et energioverføringsmiddel; et biologisk aktivt middel; et  
5 detekterbart merke; et lite molekyl; et kvantepunkt; en nanotransmitter; et radionukleotid; en radiotransmitter; et nøytron-fange middel; eller en hvilken som helst kombinasjon av de over, eller en hvilken som helst annen ønskelig forbindelse eller substans. Som et illustrerende, ikke-begrensede eksempel på sammensetningene, fremgangsmåtene, teknikkene og strategiene beskrevet heri, vil den følgende beskrivelsen fokusere på  
10 addering av makromolekylære polymerer til det ikke-naturlig aminosyre polypeptidet med den forståelse at sammensetningene, fremgangsmåtene, teknikkene og strategiene beskrevet dertil også er anvendbare (med passende modifikasjoner, hvis nødvendig og som en fagperson kunne søke seg til med redegjørelsene heri) for å legge til andre funksjonaliteter, inkludert men ikke begrenset til de listet over.

15 Et vidt mangfold av makromolekylære polymerer og andre molekyler kan være knyttet til FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse for å modulerere biologiske egenskaper av FGF-21 polypeptidet, og/eller tilveiebringe nye biologiske egenskaper for FGF-21 molekylet. Disse makromolekylære polymerene kan være knyttet til FGF-21 polypeptidet via en naturlig kodet aminosyre, via en ikke-naturlig kodet  
20 aminosyre, eller en hvilken som helst funksjonell substituent av en naturlig eller ikke-naturlig aminosyre, eller en hvilken som helst substituent eller funksjonell gruppe addert til en naturlig eller ikke-naturlig aminosyre. Molekylvekten av polymeren kan være av et vidt område, inkludert men ikke begrenset til, mellom omkring 100 Da og omkring 100.000 Da eller mer. Molekylvekten av polymeren kan være mellom omkring 100 Da og  
25 omkring 100.000 Da, inkludert men ikke begrenset til, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da  
30 og 100 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av polymeren mellom omkring 100 Da og omkring 50.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av polymeren mellom omkring 100 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av polymeren mellom omkring 1.000 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av polymeren mellom omkring 5.000 Da og omkring  
35 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av polymeren mellom omkring 10.000 Da og omkring 40.000 Da.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer hovedsakelig homogene preparater av polymer:protein konjugater. "Hovedsakelig homogen" som brukt heri betyr at polymer:protein konjugat molekyler blir observert å være mer enn halvparten av det totale



proteinet. Polymer:protein konjugatet har biologisk aktivitet og de foreliggende "hovedsakelig homogene" PEGylerte FGF-21 polypeptidpreparatene tilveiebrakt heri er de som er homogene nok til å vise fordelene av et homogent preparat, f.eks. letthet i klinisk anvendelse i forutsigbarhet av parti til parti farmakokinetikk.

5 En kan også velge å fremstille en blanding av polymer:protein konjugat molekyler, og fordelen tilveiebrakt heri er at en kan velge proporsjonen av mono-polymer:protein konjugat å inkludere i blandingen. Derfor, hvis ønsket, kan en fremstille en blanding av ulike proteiner med ulike antall av polymerandeler festet (dvs. di-, tri-, tetra-, etc.) og kombinere nevnte konjugater med mono-polymer:protein konjugatet fremstilt ved  
10 anvendelse av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, og ha en blanding med en forhåndsbestemt proporsjon av mono-polymer:protein konjugater.

Den valgte polymeren kan være vannløselig slik at proteinet som den er festet til ikke feller ut i et vandig miljø, så som et fysiologisk miljø. Polymeren kan være forgrenet eller uforgrenet. For terapeutisk anvendelse av slutt-produkt-preparatet, vil polymeren  
15 være farmasøytisk akseptabel.

Eksempler på polymerer inkluderer men er ikke begrenset til polyalkyletere og alkoksy-endedekkede analoger derav (f.eks. polyoksyetylenglykol, polyoksyetylen/-propylenglykol, og metoksy eller etoksy-endedekkede analoger derav, spesielt polyoksyetylenglykol, sistnevnte er også kjent som polyetylenglykol eller PEG);  
20 polyvinylpyrrolidoner; polyvinylalkyletere; polyoksazoliner, polyalkyloksazoliner og polyhydroksyalkyloksazoliner; polyakrylamider, polyalkylakrylamider og polyhydroksyalkylakrylamider (f.eks. polyhydroksypropylmetakrylamid og derivater derav); polyhydroksyalkylakrylater; polysialyrer og analoger derav; hydrofile peptidsekvenser; polysakkarider og deres derivater, inkludert dekstran og dekstranderivater, f.eks.  
25 karboksymetyldekstran, dekstransulfater, aminodekstran; cellulose og dets derivater, f.eks. karboksymetylcellulose, hydroksyalkylcelluloser; kitin og dets derivater, f.eks. kitosan, succinylkitosan, karboksymetylkitin, karboksymetylkitosan; hyaluronsyre og dens derivater; stivelser; alginater; kondroitinsulfat; albumin; pullulan og karboksymetylpullulan; polyaminosyrer og derivater derav, f.eks. polyglutaminsyrer, polylysiner,  
30 polyaspartinsyrer, polyaspartamider; maleinsyreanhydrid kopolymerer slik som: styren maleinsyreanhydrid kopolymer, divinyletyler maleinsyreanhydrid kopolymer; polyvinylalkoholer; kopolymerer derav; terpolymerer derav; blandinger derav; og derivater av de foregående.

Proporsjonen av polyetylenglykolmolekyler til proteinmolekyler vil variere, det  
35 samme vil deres konsentrasjoner i reaksjonsblandingen. Generelt kan det optimale forholdet (uttrykt i effektivitet av reaksjon ved at det er minimalt overskudd ureagert protein eller polymer) bli bestemt ved molekylvekten av den valgte polyetylenglykolen og av antallet tilgjengelige reaktive grupper. Når det gjelder molekylvekt, typisk jo høyere molekylvekten av polymeren er, jo mindre antall polymermolekyler kan bli festet til

proteinet. På lignende måte skulle det tas hensyn til forgrening av polymeren når en optimaliserer disse parameterne. Generelt, jo høyere molekylvekten er (eller jo flere forgreninger) jo høyere er polymer:protein forholdet.

Som anvendt heri, og når en betrakter PEG:FGF-21 polypeptid konjugater, angir  
 5 begrepet "terapeutisk effektiv mengde" en mengde som gir den ønskede fordel til en pasient. Mengden vil variere fra ett individ til et annen og vil avhenge av flere faktorer, inkludert den totale fysiske tilstand for pasienten og den underliggende årsak til tilstanden som skal bli behandlet. Mengden FGF-21 polypeptid brukt for terapi gir en akseptabel rate for forandring og opprettholder ønsket respons ved et fordelaktig nivå. En terapeutisk  
 10 effektiv mengde av de foreliggende sammensetningene kan lett bli brakt på det rene av en fagperson ved anvendelse av offentlig tilgjengelige materialer og prosedyrer.

Den vannløselige polymeren kan være en hvilken som helst strukturell form inkludert men ikke begrenset til lineær, Y-formet eller forgrenet. Typisk, er den vannløselige polymeren en poly(alkylenglykol), så som poly(etylenglykol) (PEG), men  
 15 andre vannløselige polymerer kan også bli anvendt. Som eksempel blir PEG brukt for å beskrive visse utførelsesformer av denne oppfinnelsen.

PEG er en velkjent, vannløselig polymer som er kommersielt tilgjengelig eller kan bli fremstilt ved ring-åpningspolymerisering av etylenglykol ifølge fremgangsmåter kjent for fagpersonene (Sandler og Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, bind  
 20 3, sidene 138-161). Begrepet "PEG" blir brukt bredt for å innbefatte et hvilket som helst polyetylenglykolmolekyl, uten hensyn til størrelse eller til modifikasjon ved en ende av PEGen, og kan bli representert som knyttet til FGF-21 polypeptidet ved formelen:



hvor n er 2 til 10.000 og X er H eller en terminal modifikasjon, inkludert men ikke  
 25 begrenset til, en C<sub>1-4</sub> alkyl, en beskyttende gruppe eller en terminal funksjonell gruppe.

I noen tilfeller, terminerer en PEG brukt i oppfinnelsen på én ende med hydroksy eller metoksy, dvs. X er H eller CH<sub>3</sub> ("metoksy PEG"). Alternativt, kan PEGen terminere med en reaktiv gruppe, og derved danne en bifunksjonell polymer. Typiske reaktive grupper kan inkludere de reaktive gruppene som vanligvis blir brukt for å reagere med de  
 30 funksjonelle gruppene funnet i de 20 vanlige aminosyrene (inkludert men ikke begrenset til, maleimidgrupper, aktiverte karbonater (inkludert men ikke begrenset til, p-nitrofenylester), aktiverte estere (inkludert men ikke begrenset til, N-hydroksysuccinimid, p-nitrofenylester) og aldehyder) så vel som funksjonelle grupper som er inerte overfor de 20 vanlige aminosyrene men som reagerer spesifikt med komplementære funksjonelle  
 35 grupper som foreligger i ikke-naturlig kodede aminosyrer (inkludert men ikke begrenset til, azidgrupper, alkyngrupper). Det blir anført at den andre enden av PEGen, som er vist i formelen over ved Y, vil knytte seg enten direkte eller indirekte til et FGF-21 polypeptid via en naturlig-forekommende eller ikke-naturlig kodet aminosyre. For eksempel, kan Y være en amid-, karbamat- eller ureabinding til en aminogruppe (inkludert men ikke

begrenset til, epsilon-aminet av lysin eller N-terminusen) av polypeptidet. Alternativt kan Y være en maleimidbinding til en tiolgruppe (inkludert, men ikke begrenset til, tiolgruppen av cystein). Alternativt kan Y være en binding til en rest som ikke vanligvis er tilgjengelig via de 20 vanlige aminosyrene. For eksempel, kan en azidgruppe på PEGen bli reagert med en alkyngruppe på FGF-21 polypeptidet for å danne et Huisgen [3+2] sykloaddisjonsprodukt. Alternativt kan en alkyngruppe på PEGen bli reagert med en azidgruppe som foreligger i en ikke-naturlig kodet aminosyre for å danne et lignende produkt. I noen utførelsesformer kan en sterk nukleofil (inkludert men ikke begrenset til, hydrazin, hydrazid, hydroksylamin, semikarbazid) bli reagert med en aldehyd- eller ketongruppe som foreligger i en ikke-naturlig kodet aminosyre for å danne et hydrazon, oksim eller semikarbazon, ettersom det passer, som i noen tilfeller kan bli videre redusert ved behandling med et passende reduksjonsmiddel. Alternativt kan den sterke nukleofilen bli inkorporert inn i FGF-21 polypeptidet via en ikke-naturlig kodet aminosyre og brukt for å reagere fortrinnsvis med en keton- eller aldehydgruppe som foreligger i den vannløselige polymeren.

En hvilken som helst molekylmasse for en PEG kan bli brukt ettersom praktisk ønsket, inkludert men ikke begrenset til, fra omkring 100 Dalton (Da) til 100.000 Da eller mer ettersom ønsket (inkludert men ikke begrenset til, noen ganger 0,1-50 kDa eller 10-40 kDa). Molekylvekten av PEG kan være av et vidt område, inkludert men ikke begrenset til, mellom omkring 100 Da og omkring 100.000 Da eller mer. PEG kan være mellom omkring 100 Da og omkring 100.000 Da, inkludert men ikke begrenset til, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da og 100 Da. I noen utførelsesformer er PEG mellom omkring 100 Da og omkring 50.000 Da. I noen utførelsesformer er PEG mellom omkring 100 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er PEG mellom omkring 1.000 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er PEG mellom omkring 5.000 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er PEG mellom omkring 10.000 Da og omkring 40.000 Da. Forgrenet kjede PEGer, inkludert men ikke begrenset til, PEG molekyler hvor hver kjede har en MW som spenner fra 1-100 kDa (inkludert men ikke begrenset til, 1-50 kDa eller 5-20 kDa) kan også bli brukt. Molekylvekten av hver kjede av forgrenet kjede PEGen kan være, inkludert men ikke begrenset til, mellom omkring 1.000 Da og omkring 100.000 Da eller mer. Molekylvekten av hver kjede av forgrenet kjede PEGen kan være mellom omkring 1.000 Da og omkring 100.000 Da, inkludert men ikke begrenset til, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000

Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da og 1.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av hver kjede av forgrenet kjede PEGen mellom omkring 1.000 Da og omkring 50.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av hver kjede av forgrenet kjede PEGen mellom omkring 1.000 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av hver kjede av forgrenet kjede PEGen mellom omkring 5.000 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av hver kjede av forgrenet kjede PEGen mellom omkring 5.000 Da og omkring 20.000 Da. Et vidt område av PEG molekyler er beskrevet i, inkludert men ikke begrenset til, the Shearwater Polymers, Inc. katalog, Nektar Therapeutics katalog.

Generelt er minst én terminus av PEG molekylet tilgjengelig for reaksjon med den ikke-naturlig-kodede aminosyren. For eksempel, kan PEG-derivater som bærer alkyn- og azid-andeler for reaksjon med aminosyresidekjeder bli brukt for å feste PEG til ikke-naturlig kodede aminosyrer som beskrevet heri. Hvis den ikke-naturlig kodede aminosyren omfatter et azid, så vil PEGen typisk inneholde enten en alkyn-andel for å bevirke dannelse av [3+2] sykloaddisjonsproduktet eller en aktivert PEG type (dvs. ester, karbonat) inneholdende en fosfingruppe for å bevirke dannelse av amidbindingen. Alternativt, hvis den ikke-naturlig kodede aminosyren omfatter et alkyn, så vil PEGen typisk inneholde en azid-andel for å bevirke dannelse av [3+2] Huisgen sykloaddisjonsproduktet. Hvis den ikke-naturlig kodede aminosyren omfatter en karbonylgruppe, vil PEGen typisk omfatte en potent nukleofil (inkludert men ikke begrenset til, en hydrazid-, hydrazin-, hydroksylamin- eller semikarbazidfunksjonalitet) for å bevirke dannelse av henholdsvis tilsvarende hydrazon-, oksim- og semikarbazonbindinger. I andre alternativer, kan det bli brukt en omvendt av orienteringen av de reaktive gruppene beskrevet over, dvs. en azid-andel i den ikke-naturlig kodede aminosyren kan bli reagert med et PEG-derivat inneholdende et alkyn.

I noen utførelsesformer, inneholder FGF-21 polypeptidvarianten med et PEG-derivat en kjemisk funksjonalitet som er reaktiv med den kjemiske funksjonaliteten som foreligger på sidekjeden av den ikke-naturlig kodede aminosyren.

Oppfinnelsen tilveiebringer i noen utførelsesformer azid- og acetylen-holdige polymerderivater omfattende en vannløselig polymerryggrad som har en gjennomsnittlig molekylvekt fra omkring 800 Da til omkring 100.000 Da. Polymerryggraden av den vannløselige polymeren kan være poly(etylen glykol). Det skulle imidlertid bli forstått at en lang rekke vannløselige polymerer inkludert men ikke begrenset til poly(etylen)glykol og andre beslektede polymerer, inkludert poly(dekstran) og poly(propylen glykol), også er egnet for bruk i den praktiske utførelse av denne oppfinnelsen og at anvendelsen av begrepet PEG eller poly(etylen glykol) er tenkt å innbefatte og inkludere alle slike molekyler. Begrepet PEG inkluderer, men er ikke begrenset til, poly(etylen glykol) i en hvilken som helst av dens former, inkludert bifunksjonell PEG, flerarmet PEG, derivatisert PEG, Y-formet PEG, forgrenet PEG, hengende PEG (dvs. PEG eller

beslektede polymerer som har én eller flere funksjonelle grupper hengende til polymerryggraden) eller PEG med nedbrytbare bindinger deri.

PEG er typisk klar, fargeløs, luktfri, løselig i vann, stabil overfor varme, inert overfor mange kjemiske midler, hydrolyserer eller forringes ikke og er generelt ikke-toksisk. Poly(etylenglykol) blir vurdert til å være biokompatibel, som vil si at PEG er i stand til sameksistens med levende vev eller organismer uten å forårsake skade. Mer spesifikt er PEG hovedsakelig ikke-immunogen, noe som vil si at PEG ikke har tendens til å produsere en immunrespons i kroppen. Når festet til et molekyl som har en ønskelig funksjon i kroppen, så som et biologisk aktivt middel, har PEG en tendens til å maskere midlet og kan redusere eller eliminere en hvilken som helst immunrespons slik at en organisme kan tolerere nærværet av midlet. PEG konjugater har en tendens til å ikke danne en betydelig immunrespons eller forårsake fortykning eller andre uønskede virkninger. PEG som har formelen  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , hvor  $n$  er fra omkring 3 til omkring 4000, typisk fra omkring 20 til omkring 2000, er egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse. PEG som har en molekylvekt på fra omkring 800 Da til omkring 100.000 Da er i noen utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse spesielt nyttige som polymerryggraden. Molekylvekten av PEG kan være av et vidt område, inkludert men ikke begrenset til, mellom omkring 100 Da og omkring 100.000 Da eller mer. Molekylvekten av PEG kan være mellom omkring 100 Da og omkring 100.000 Da, inkludert men ikke begrenset til, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da og 100 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av PEG mellom omkring 100 Da og omkring 50.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av PEG mellom omkring 100 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av PEG mellom omkring 1.000 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av PEG mellom omkring 5.000 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av PEG mellom omkring 10.000 Da og omkring 40.000 Da.

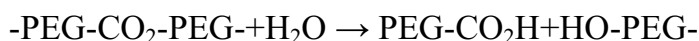
Polymerryggraden kan være lineær eller forgrenet. Forgrenede polymerryggrader er generelt kjent innen faget. Typisk, har en forgrenet polymer en sentral forgreningskjerneandel og mange lineære polymerkjeder knyttet til den sentrale forgreningskjernen. PEG blir vanligvis brukt i forgrenede former som kan bli fremstilt ved tilsetning av etylenoksid til ulike polyoler, så som glyserol, glyserololigomerer, pentaerytritol og sorbitol. Den sentrale forgreningsandelen kan også være avledet fra mange aminosyrer, så som lysin. Den forgrenede poly(etylenglykol) kan bli representert i generell form som  $\text{R}(-\text{PEG}-\text{OH})_m$  hvor  $\text{R}$  er avledet fra en kjerneandel, så som glyserol, glyserololigomerer eller pentaerytritol, og  $m$  representerer antallet armer. Fler-armede PEG molekyler, så som de

beskrevet i U.S. pat. nr. 5,932,462; 5,643,575; 5,229,490; 4,289,872; U.S. pat. søkn. 2003/0143596; WO 96/21469; og WO 93/21259, kan også bli brukt som polymer-ryggraden.

Forgrenet PEG kan også være i form av en Y-formet PEG representert ved  
 5 PEG(-YCHZ<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, hvor Y er en sammenbindende gruppe og Z er en aktivert terminal gruppe knyttet til CH ved en kjede av atomer av definert lengde.

Enda en annen forgrenet form, den hengende PEG, har reaktive grupper, så som karboksyl, langs PEGryggraden snarere enn ved enden av PEG-kjeder.

I tillegg til disse formene av PEG, kan polymeren også bli fremstilt med svake eller  
 10 nedbrytbare bindinger i ryggraden. For eksempel kan PEG bli fremstilt med esterbindinger i polymerryggraden som er utsatt for hydrolyse. Som vist under, resulterer denne hydrolysen i spalting av polymeren til fragmenter med lavere molekylvekt:



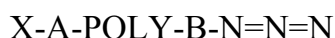
Det blir forstått ved fagpersonene at begrepet poly(etylenglykol) eller PEG representerer  
 15 eller inkluderer alle formene kjent innen faget inkludert men ikke begrenset til de vist heri.

Mange andre polymerer er også egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse. I noen utførelsesformer er polymerryggrader som er vann-løselige, med fra 2 til omkring 300  
 20 termini, spesielt nyttige i oppfinnelsen. Eksempler på egnede polymerer inkluderer, men er ikke begrenset til, andre poly(alkylenglykoler), så som poly(propylenglykol) ("PPG"), kopolymerer derav (inkludert men ikke begrenset til kopolymerer av etylenglykol og propylenglykol), terpolymerer derav, blandinger derav og lignende. Selv om molekylvekten av hver kjede av polymerryggraden kan variere, er den typisk i området på fra omkring 800 Da til omkring 100.000 Da, ofte fra omkring 6.000 Da til omkring 80.000  
 25 Da. Molekylvekten av hver kjede av polymerryggraden kan være mellom omkring 100 Da og omkring 100.000 Da, inkludert men ikke begrenset til, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da,  
 30 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da og 100 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av hver kjede av polymerryggraden mellom omkring 100 Da og omkring 50.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av hver kjede av polymerryggraden mellom omkring 100 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av hver kjede av polymerryggraden mellom omkring 1.000 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av hver kjede av polymerryggraden mellom omkring 5.000 Da og omkring 40.000 Da. I noen utførelsesformer er molekylvekten av hver kjede av polymerryggraden mellom omkring 10.000 Da og omkring 40.000 Da.

Fagpersonene innen faget vil erkjenne at den foregående listen for hovedsakelig vannløselige ryggrader ikke på noen måte er uttømmende og utelukkende er illustrerende, og at alle polymere materialer som har kvalitetene beskrevet over er vurdert som å være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse.

5 I noen utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse er polymerderivatene "multi-funksjonelle", noe som betyr at polymerryggraden har minst to termini, og muligens så mange som omkring 300 termini, funksjonalisert eller aktivert med en funksjonell gruppe. Multifunksjonelle polymerderivater inkluderer, men er ikke begrenset til, lineære polymerer som har to termini, hver terminus er bundet til en funksjonell gruppe som kan  
10 være de samme eller forskjellige.

I én utførelsesform, har polymerderivatet strukturen:



hvor:

N=N=N er en azid-andel;

15 B er en sammenbindende andel, som kan være til stede eller fraværende;

POLY er en vann-løselig ikke-antigen polymer;

A er en sammenbindende andel, som kan være til stede eller fraværende og som kan være den samme som B eller forskjellig; og

X er en andre funksjonell gruppe.

20 Eksempler på en sammenbindende andel for A og B inkluderer, men er ikke begrenset til, en multippelt-funksjonalisert alkylgruppe inneholdende opp til 18, og kan inneholde mellom 1-10 karbonatomer. Et heteroatom så som nitrogen, oksygen eller svovel kan være inkludert med alkylkjeden. Alkylkjeden kan også være forgrenet ved et heteroatom. Andre eksempler på en sammenbindende andel for A og B inkluderer, men er ikke  
25 begrenset til, en multippelt funksjonalisert arylgruppe, inneholdende opp til 10 og kan inneholde 5-6 karbonatomer. Arylgruppen kan være substituert med én flere karbonatomer, nitrogen-, oksygen- eller svovelatomer. Andre eksempler på egnede sammenbindende grupper inkluderer de sammenbindende gruppene beskrevet i U.S. pat. nr. 5,932,462; 5,643,575; og U.S. pat. søkn. publikasjon 2003/0143596. Fagpersonene vil  
30 erkjenne at den foregående listen for sammenbindende andeler ikke på noen måte er uttømmende og utelukkende er illustrerende, og at alle sammenbindende andeler som har kvalitetene beskrevet over blir vurdert til å være egnet for bruk i foreliggende oppfinnelse.

Eksempler på egnede funksjonelle grupper for bruk som X inkluderer, men er ikke begrenset til, hydroksyl, beskyttet hydroksyl, alkoksyl, aktiv ester, så som N-hydrokxy-succinimidylestere og 1-benzotriazolylestere, aktivt karbonat, så som N-hydrokxy-succinimidylkarbonater og 1-benzotriazolylkarbonater, acetal, aldehyd, aldehydhydrater,  
35 alkenyl, akrylat, metakrylat, akrylamid, aktivt sulfon, amin, aminooksy, beskyttet amin, hydrazid, beskyttet hydrazid, beskyttet tiol, karboksylsyre, beskyttet karboksylsyre,

isocyanat, isotiocyanat, maleimid, vinylsulfon, ditiopyridin, vinylpyridin, jodacetamid, epoksid, glyksaler, dioner, mesylater, tosylater, tresylat, alken, keton og azid. Som det blir forstått ved fagfolkene, skulle den valgte X-andelen være kompatibel med azidgruppen slik at reaksjon med azidgruppen ikke forekommer. De azid-holdige

5 polymerderivatene kan være homobifunksjonelle, som betyr at den andre funksjonelle gruppen (dvs. X) også er en azid-andel, eller heterobifunksjonell, som betyr at den andre funksjonelle gruppen er en forskjellig funksjonell gruppe.

Begrepet "beskyttet" angir nærværet av en beskyttende gruppe eller andel som forhindrer reaksjon av den kjemisk reaktive funksjonelle gruppen under visse

10 reaksjonsbetingelser. Den beskyttende gruppen vil variere avhengig av typen kjemisk reaktiv gruppe som blir beskyttet. For eksempel, hvis den kjemisk reaktive gruppen er et amin eller et hydrazid, kan den beskyttende gruppen være valgt fra gruppen av tert-butylloksykarbonyl (t-Boc) og 9-fluorenylmetoksykarbonyl (Fmoc). Hvis den kjemisk reaktive gruppen er en tiol, kan den beskyttende gruppen være ortopyridyldisulfid. Hvis

15 den kjemisk reaktive gruppen er en karboksylsyre, så som butan- eller propionsyre, eller en hydroksylgruppe, kan den beskyttende gruppen være benzyl eller en alkylgruppe så som metyl, etyl eller tert-butyl. Andre beskyttende grupper kjent innen faget kan også bli brukt i foreliggende oppfinnelse.

Spesifikke eksempler på terminale funksjonelle grupper i litteraturen inkluderer,

20 men er ikke begrenset til, N-succinimidylkarbonat (se f.eks. U.S. pat. nr. 5,281,698, 5,468,478), amin (se, f.eks. Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hydrazid (Se, f.eks. Andresz et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978)), succinimidylpropionat og succinimidylbutanoat (se, f.eks. Olson et al. i Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, s. 170-

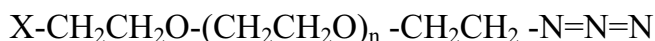
25 181, Harris & Zalipsky red., ACS, Washington, D.C., 1997; se også U.S. pat. nr. 5,672,662), succinimidylsuccinat (Se, f.eks. Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) og Joppich et al. Makromol. Chem. 180:1381 (1979), succinimidylester (se, f.eks. U.S. pat. nr. 4,670,417), benzotriazolkarbonat (se, f.eks. U.S. pat. nr. 5,650,234), glysidyleter (se, f.eks. Pitha et al. Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling et al., Biotech.

30 Appl. Biochem. 13:354 (1991), oksykarbonylimidazol (se, f.eks. Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release 1:251 (1985)), p-nitrofenylkarbonat (se, f.eks. Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); og Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), aldehyd (se, f.eks. Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984) U.S. pat. nr. 5,824,784, U.S. pat. nr. 5,252,714), maleimid

35 (se, f.eks. Goodson et al. Biotechnology (NY) 8:343 (1990), Romani et al. i Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), og Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), ortopyridyl-disulfid (se, f.eks. Woghiren, et al. Bioconj. Chem. 4:314(1993)), akrylol (se, f.eks. Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)), vinylsulfon (se, f.eks. U.S. pat. nr. 5,900,461).



I visse utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse, omfatter polymerderivatene ifølge oppfinnelsen en polymerryggrad som har strukturen:



hvor:

- 5 X er en funksjonell gruppe som beskrevet over; og  
n er omkring 20 til omkring 4000.

I en annen utførelsesform, omfatter polymerderivatene ifølge oppfinnelsen en polymerryggrad som har strukturen:



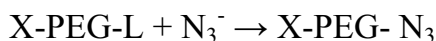
10 hvor:

W er en alifatisk eller aromatisk linkerandel omfattende mellom 1-10 karbonatomer;

n er omkring 20 til omkring 4000; og

X er en funksjonell gruppe som beskrevet over. m er mellom 1 og 10.

- 15 De azid-holdige PEG-derivatene ifølge oppfinnelsen kan bli fremstilt ved et mangfold av fremgangsmåter kjent innen faget og/eller vist heri. I én fremgangsmåte, vist under, blir en vannløselig polymerryggrad som har en gjennomsnittlig molekylvekt fra omkring 800 Da til omkring 100.000 Da, polymerryggraden har en første terminus bundet til en første funksjonelle gruppe og en andre terminus bundet til en egnet forlatende
- 20 gruppe, reagert med et azidanion (som kan være parett med hvilket som helst av flere egnede mot-ioner, inkludert natrium, kalium, tert-butylammonium og så videre). Den forlatende gruppen undergår en nukleofil forskyvning og blir erstattet ved azid-andelen, noe som gir den ønskede azid-holdige PEG-polymeren.



- 25 Som vist, har en egnet polymerryggrad for bruk i foreliggende oppfinnelse formelen X-PEG-L, hvor PEG er poly(etylenglykol) og X er en funksjonell gruppe som ikke reagerer med azidgrupper og L er en egnet forlatende gruppe. Eksempler på egnede funksjonelle grupper inkluderer, men er ikke begrenset til, hydroksyl, beskyttet hydroksyl, acetal, alkenyl, amin, aminooksy, beskyttet amin, beskyttet hydrazid, beskyttet tiol,
- 30 karboksylsyre, beskyttet karboksylsyre, maleimid, ditiopyridin og vinylpyridin og keton. Eksempler på egnede forlatende grupper inkluderer, men er ikke begrenset til, klorid, bromid, jodid, mesylat, tresylat og tosylat.

- I en annen fremgangsmåte for fremstilling av de azid-holdige polymerderivatene ifølge foreliggende oppfinnelse, blir et sammenbindende middel som bærer en
- 35 azidfunksjonalitet brakt i kontakt med en vannløselig polymerryggrad som har en gjennomsnittlig molekylvekt fra omkring 800 Da til omkring 100.000 Da, hvor det sammenbindende midlet bærer en kjemisk funksjonalitet som vil reagere selektivt med en

kjemisk funksjonalitet på PEG-polymeren, for å danne et azid-holdig polymerderivatprodukt hvori azidet blir skilt fra polymerryggraden ved en sammenbindende gruppe.

Et eksempelvis reaksjonsskjema er vist under:



5 hvori:

PEG er poly(etylenglykol) og X er en endedeckende gruppe så som alkoksy eller en funksjonell gruppe som beskrevet over; og

M er en funksjonell gruppe som ikke er reaktiv med azidfunksjonaliteten men som vil reagere effektivt og selektivt med den N funksjonelle gruppen.

10 Eksempler på egnede funksjonelle grupper inkluderer, men er ikke begrenset til, at M er en karboksylsyre, karbonat eller aktiv ester hvis N er et amin; M er et keton hvis N er en hydrazid- eller aminooksyandel; M er en forlatende gruppe hvis N er en nukleofil.

Rensing av råproduktet kan bli gjennomført ved kjente fremgangsmåter inkludert, men er ikke begrenset til, utfelling av produktet fulgt av kromatografi, hvis nødvendig.

15 Et mer spesifikt eksempel er vist under i tilfellet med PEG diamin, hvor ett av aminene er beskyttet ved en beskyttende gruppe andel så som tert-butyl-Boc og det resulterende mono-beskyttede PEG diaminet blir reagert med en sammenbindende andel som bærer azidfunksjonaliteten:



20 I dette eksempelet, kan amingruppen bli koplet til karboksylsyregruppen ved anvendelse av et mangfold av aktiverende midler så som tionylklorid eller karbodiimidreagenser og N-hydroksysuccinimid eller N-hydroksybenzotriazol for å danne en amidbinding mellom monoamin PEG-derivatet og den azid-bærende linkerandelen. Etter vellykket dannelse av amidbindingen, kan det resulterende N-tert-butyl-Boc-beskyttede azid-holdige derivatet bli brukt direkte for å modifisere bioaktive molekyler eller det kan bli videre foredlet for å installere andre nyttige funksjonelle grupper. For eksempel, kan N-t-Boc gruppen bli hydrolysert ved behandling med sterk syre for å generere et omega-amino-PEG-azid. Det resulterende aminet kan bli brukt som et syntetisk håndtak for å installere annen nyttig funksjonalitet så som maleimidgrupper, aktiverte disulfider, 25 aktiverte estere og så videre for dannelsen av verdifulle heterobifunksjonelle reagenser.

Heterobifunksjonelle derivater er spesielt nyttige når det er ønsket å knytte forskjellige molekyler til hver terminus av polymeren. For eksempel, ville omega-N-amino-N-azido PEGen tillate tilknytningen av et molekyl som har en aktivert elektrofil gruppe, så som et aldehyd, keton, aktivert ester, aktivert karbonat og så videre, til én 35 terminus av PEGen og et molekyl som har en acetylengruppe til den andre terminusen av PEGen.

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, har polymerderivatet strukturen:



hvor:

R kan være enten H eller en alkyl-, alken-, alkyoksy- eller aryl- eller substituert arylgruppe;

B er en sammenbindende andel, som kan være til stede eller fraværende;

POLY er en vann-løselig ikke-antigen polymer;

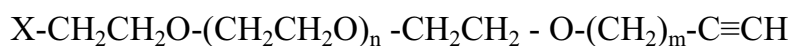
5 A er en sammenbindende andel, som kan være til stede eller fraværende og som kan være den samme som B eller forskjellig; og

X er en andre funksjonell gruppe.

Eksempler på en sammenbindende andel for A og B inkluderer, men er ikke begrenset til, en multippelt-funksjonalisert alkylgruppe inneholdende opp til 18, og kan  
10 inneholde mellom 1-10 karbonatomer. Et heteroatom så som nitrogen, oksygen eller svovel kan være inkludert med alkylkjeden. Alkylkjeden kan også være forgrenet ved et heteroatom. Andre eksempler på en sammenbindende andel for A og B inkluderer, men er ikke begrenset til, en multippelt funksjonalisert arylgruppe, inneholdende opp til 10 og kan inneholde 5-6 karbonatomer. Arylgruppen kan være substituert med én flere  
15 karbonatomer, nitrogen-, oksygen- eller svovelatomer. Andre eksempler på egnede sammenbindende grupper inkluderer de sammenbindende gruppene beskrevet i U.S. pat. nr. 5,932,462 og 5,643,575 og U.S. pat. søkn. publikasjon 2003/0143596. Fagpersonene vil erkjenne at den foregående listen for sammenbindende andeler ikke på noen måte er uttømmende og er tenkt å være utelukkende illustrerende, og at en lang rekke sammen-  
20 bindende andeler som har kvalitetene beskrevet over blir vurdert til å være nyttige i foreliggende oppfinnelse.

Eksempler på egnede funksjonelle grupper for bruk som X inkluderer hydroksyl, beskyttet hydroksyl, alkoksyl, aktiv ester, så som N-hydroksysuccinimidylestere og 1-  
25 benzotriazolestere, aktivt karbonat, så som N-hydroksysuccinimidylkarbonater og 1-benzotriazolylkarbonater, acetal, aldehyd, aldehydhydrater, alkenyl, akrylat, metakrylat, akrylamid, aktivt sulfon, amin, aminoksy, beskyttet amin, hydrazid, beskyttet hydrazid, beskyttet tiol, karboksylsyre, beskyttet karboksylsyre, isocyanat, isotiocyanat, maleimid, vinylsulfon, ditiopyridin, vinylpyridin, jodacetamid, epoksid, glyoksaler, dioner, mesylater, tosylater, og tresylat, alken, keton, og acetylen. Som det ville bli forstått, skulle  
30 den valgte X-andelen være kompatibel med acetylengruppen slik at reaksjon med acetylengruppen ikke forekommer. De acetylen-holdige polymerderivatene kan være homobifunksjonelle, noe som betyr at den andre funksjonelle gruppen (dvs. X) også er en acetylenandel eller heterobifunksjonelle, noe som betyr at den andre funksjonelle gruppen er en forskjellig funksjonell gruppe.

35 I en annen utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, omfatter polymerderivatene en polymerryggrad som har strukturen:



hvor:

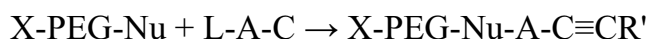
X er en funksjonell gruppe som beskrevet over;

n er omkring 20 til omkring 4000; og

m er mellom 1 og 10.

Spesifikke eksempler på hver av de heterobifunksjonelle PEG-polymerene er vist  
5 under.

De acetylen-holdige PEG-derivatene ifølge oppfinnelsen kan bli fremstilt ved  
anvendelse av fremgangsmåter kjent for fagpersonene og/eller vist heri. I én fremgangs-  
måte, blir en vannløselig polymerryggrad som har en gjennomsnittlig molekylvekt fra  
omkring 800 Da til omkring 100.000 Da, polymerryggraden har en første terminus bundet  
10 til en første funksjonelle gruppe og en andre terminus bundet til en egnet nukleofil  
gruppe, reagert med en forbindelse som bærer både en acetylenfunksjonalitet og en  
forlatende gruppe som er egnet for reaksjon med den nukleofile gruppen på PEGen. Når  
PEG-polymeren som bærer den nukleofile andelen og molekylet som bærer den  
forlatende gruppen blir kombinert, undergår den forlatende gruppen en nukleofil  
15 forskyvning og blir erstattet ved den nukleofile andelen, noe som gir den ønskede  
acetylen-holdige polymeren.



Som vist, har en foretrukket polymerryggrad for bruk i reaksjonen formelen X-  
PEG-Nu, hvori PEG er poly(etylenglykol), Nu er en nukleofil andel og X er en  
20 funksjonell gruppe som ikke reagerer med Nu, L eller acetylenfunksjonaliteten.

Eksempler på Nu inkluderer, men er ikke begrenset til, amin-, alkoksy-, aryloksy-,  
sulfhydryl-, imino-, karboksylat-, hydrazid-, aminoksygrupper som ville reagere primært  
via en SN2-type mekanisme. Ytterligere eksempler på Nu-grupper inkluderer de  
funksjonelle gruppene som ville reagere primært via en nukleofil addisjonsreaksjon.  
25 Eksempler på L-grupper inkluderer klorid, bromid, jodid, mesylat, tresylat og tosylat og  
andre grupper forventet å undergå nukleofil forskyvning så vel som ketoner, aldehyder,  
tioestere, olefiner, alfa-beta umettede karbonylgrupper, karbonater og andre elektrofile  
grupper forventet å undergå addisjon ved nukleofiler.

I en annen utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, er A en alifatisk linker med  
30 mellom 1-10 karbonatomer eller en substituert arylring med mellom 6-14 karbonatomer.  
X er en funksjonell gruppe som ikke reagerer med azidgrupper og L er en egnet forlatende  
gruppe

I en annen fremgangsmåte for fremstilling av de acetylen-holdige polymer-  
derivatene ifølge oppfinnelsen, blir en PEG-polymer som har en gjennomsnittlig  
35 molekylvekt fra omkring 800 Da til omkring 100.000 Da, som bærer enten en beskyttet  
funksjonell gruppe eller et endedekkende middel ved én terminus og en egnet forlatende  
gruppe ved den andre terminusen, brakt i kontakt med et acetylenanion.

Et eksempelvis reaksjonsskjema er vist under:



hvor:

PEG er poly(etylenglykol) og X er en endedekkende gruppe så som alkoksy eller en funksjonell gruppe som beskrevet over; og

R' er enten H, en alkyl-, alkoksy-, aryl- eller aryloksygruppe eller en substituert alkyl-, alkoksy-, aryl- eller aryloksygruppe.

I eksempelet over, skulle den forlatende gruppen L være tilstrekkelig reaktiv til å undergå SN2-type forskyvning når brakt i kontakt med en tilstrekkelig konsentrasjon av acetylenanionet. Reaksjonsbetingelsene krevet for å oppnå SN2-forskyvning av de forlatende gruppene ved acetylenanioner er kjent for fagpersonene.

Rensing av råproduktet kan vanligvis bli gjennomført ved fremgangsmåter kjent innen faget inkludert, men er ikke begrenset til, utfelling av produktet fulgt av kromatografi, hvis nødvendig.

Vannløselige polymerer kan være knyttet til FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen. De vannløselig polymerene kan være tilknyttet via en ikke-naturlig kodet aminosyre inkorporert i FGF-21 polypeptidet eller en hvilken som helst funksjonell gruppe eller substituent av en ikke-naturlig kodet eller naturlig kodet aminosyre, eller en hvilken som helst funksjonell gruppe eller substituent addert til en ikke-naturlig kodet eller naturlig kodet aminosyre. Alternativt er de vannløselig polymerene knyttet til et FGF-21 polypeptid som inkorporerer en ikke-naturlig kodet aminosyre via en naturlig-forekommende aminosyre (inkludert men ikke begrenset til, cystein, lysin eller amingruppen av den N-terminale resten). FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen omfatter 1 ikke-naturlig aminosyre, hvori én ikke-naturlig-kodet aminosyre er knyttet til vannløselig(e) polymer(er) (inkludert men ikke begrenset til, PEG og/eller oligo-sakkarider). I noen tilfeller, omfatter FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen videre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, eller flere naturlig-kodede aminosyre(r) knyttet til vannløselige polymerer. I noen tilfeller, omfatter FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen én eller flere ikke-naturlig kodede aminosyre(r) knyttet til vannløselige polymerer og én eller flere naturlig-forekommende aminosyrer knyttet til vannløselige polymerer. I noen utførelsesformer, forbedrer de vannløselige polymerene brukt i foreliggende oppfinnelse serum-halveringstiden av FGF-21 polypeptidet i forhold til den ukonjugerte formen.

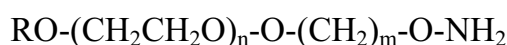
Antallet vannløselige polymerer knyttet til et FGF-21 polypeptid (dvs. utstrekningen av PEGylering eller glykosylering) ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli regulert for å tilveiebringe en endret (inkludert men ikke begrenset til, øket eller redusert) farmakologisk, farmakokinetisk eller farmakodynamisk karakteristikk så som in vivo halveringstid. I noen utførelsesformer, blir halveringstiden av FGF-21 øket minst omkring 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 prosent, 2-ganger, 5-ganger, 6-ganger, 7-ganger, 8-ganger, 9-ganger, 10-ganger, 11-ganger, 12-ganger, 13-ganger, 14-ganger, 15-ganger, 16-ganger, 17-ganger, 18-ganger, 19-ganger, 20-ganger, 25-ganger, 30-ganger, 35-ganger,

40-ganger, 50-ganger, eller minst omkring 100-ganger i forhold til et umodifisert polypeptid.

PEG-derivater inneholdende en sterk nukleofil gruppe (dvs. hydrazid, hydrazin, hydroksylamin eller semikarbazid)

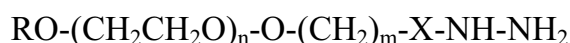
I én utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, blir et FGF-21 polypeptid omfattende en karbonyl-holdig ikke-naturlig kodet aminosyre modifisert med et PEG-derivat som inneholder en terminal hydrazin-, hydroksylamin-, hydrazid- eller semikarbazidandel som er knyttet direkte til PEG-ryggraden.

I noen utførelsesformer, vil det hydroksylamin-terminale PEG-derivatet ha strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10 og n er 100-1.000 (dvs. gjennomsnittlig molekylvekt er mellom 5-40 kDa).

I noen utførelsesformer, vil det hydrazin- eller hydrazid-holdige PEG-derivatet ha strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10 og n er 100-1.000 og X er eventuelt en karbonylgruppe (C=O) som kan være til stede eller fraværende.

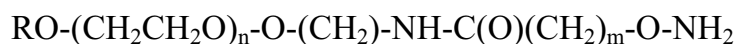
I noen utførelsesformer, vil det semikarbazid-holdige PEG-derivatet ha strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10 og n er 100-1.000.

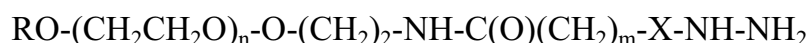
I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid omfattende en karbonyl-holdig aminosyre modifisert med et PEG-derivat som inneholder en terminal hydroksylamin-, hydrazid-, hydrazin- eller semikarbazidandel som er knyttet til PEG-ryggraden ved hjelp av en amidbinding.

I noen utførelsesformer, har de hydroksylamin-terminale PEG-derivatene strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10 og n er 100-1.000 (dvs. gjennomsnittlig molekylvekt er mellom 5-40 kDa).

I noen utførelsesformer, har de hydrazin- eller hydrazid-holdige PEG-derivatene strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10, n er 100-1.000 og X er eventuelt en karbonylgruppe (C=O) som kan være til stede eller fraværende.

I noen utførelsesformer, har de semikarbazid-holdige PEG-derivatene strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10 og n er 100-1.000.

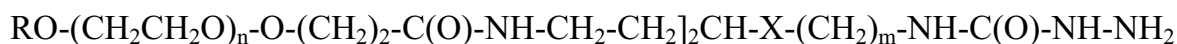
I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid omfattende en karbonyl-holdig aminosyre modifisert med et forgrenet PEG-derivat som inneholder en terminal hydrazin-, hydroksylamin-, hydrazid- eller semikarbazidandel, hvor hver kjede av den forgrenede PEGen har en MW som spenner fra 10-40 kDa og, kan være fra 5-20 kDa.

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre modifisert med et PEG-derivat som har en forgrenet struktur. For eksempel, i noen utførelsesformer, vil det hydrazin- eller hydrazid-terminale PEG-derivatet ha den følgende strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10 og n er 100-1.000, og X er eventuelt en karbonylgruppe (C=O) som kan være til stede eller fraværende.

I noen utførelsesformer, vil PEG-derivatene inneholdende en semikarbazidgruppe ha strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), X er eventuelt NH, O, S, C(O) eller ikke til stede, m er 2-10 og n er 100-1.000.

I noen utførelsesformer, vil PEG-derivatene inneholdende en hydroksylamingruppe ha strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), X er eventuelt NH, O, S, C(O) eller ikke til stede, m er 2-10 og n er 100-1.000.

Graden og setene hvor den vannløselige polymeren(e) er knyttet til FGF-21 polypeptidet kan modulere bindingen av FGF-21 polypeptidet til FGF-21 polypeptidreseptoren. I noen utførelsesformer er bindingene arrangert slik at FGF-21 polypeptidet binder FGF-21 polypeptidreseptoren med en  $K_d$  på omkring 400 nM eller lavere, med en  $K_d$  på 150 nM eller lavere, og i noen tilfeller med en  $K_d$  på 100 nM eller lavere, som målt ved en likevektbindingsanalyse, så som den beskrevet i Spencer et al., J. Biol. Chem., 263:7862-7867 (1988) for FGF-21.

Fremgangsmåter og kjemi for aktivering av polymerer så vel som for konjugering av peptider er beskrevet i litteraturen og er kjent innen faget. Vanligvis brukte fremgangsmåter for aktivering av polymerer inkluderer, men er ikke begrenset til, aktivering av funksjonelle grupper med cyanogenbromid, perjodat, glutaraldehyd, biepoksid, epiklorhydrin, divinylsulfon, karbodiimid, sulfonylhalogenider, triklortriazin, etc. (se, R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILIZATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson et al., (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L., et al., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG

DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Mange gjennomganger og monografier på funksjonaliseringen og konjugeringen av PEG er tilgjengelige. Se, for eksempel, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong et al., *Enzym Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995).

Fremgangsmåter for aktivering av polymerer kan også bli funnet i WO 94/17039, U.S. pat. nr. 5,324,844, WO 94/18247, WO 94/04193, U.S. pat. nr. 5,219,564, U.S. pat. nr. 5,122,614, WO 90/13540, U.S. pat. nr. 5,281,698 og WO 93/15189, og for konjugering mellom aktiverte polymerer og enzymer inkludert men ikke begrenset til koaguleringsfaktor VIII (WO 94/15625), hemoglobin (WO 94/09027), oksygenbærende molekyl (U.S. pat. nr. 4,412,989), ribonuklease og superoksid dismutase (Veronese et al., *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-52 (1985)).

PEGylering (dvs. addisjon av en hvilken som helst vannløselig polymer) av FGF-21 polypeptider inneholdende en ikke-naturlig kodet aminosyre, så som *p*-azido-L-fenylalanin, blir utført ved en hvilken som helst høvelig fremgangsmåte. For eksempel, blir FGF-21 polypeptid PEGylert med et alkyn-terminert mPEG-derivat. Kort fortalt blir et overskudd av fast mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH tilsatt, med omrøring, til en vandig løsning av *p*-azido-L-Phe-holdig FGF-21 polypeptid ved romtemperatur. Typisk er den vandige løsningen bufret med en buffer som har en pK<sub>a</sub> nær pH-en som reaksjonen skal bli utført ved (generelt omkring pH 4-10). Eksempler på egnede buffere for PEGylering ved pH 7,5, for eksempel, inkluderer, men er ikke begrenset til, HEPES, fosfat, borat, TRIS-HCl, EPPS og TES. pH-en blir kontinuerlig overvåket og regulert hvis nødvendig. Reaksjonen blir typisk tillatt å fortsette i mellom omkring 1-48 timer.

Reaksjonsproduktene blir deretter underkastet hydrofob vekselvirkningskromatografi for å separere de PEGylerte FGF-21 polypeptidvariantene fra fritt mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH og hvilke som helst høy-molekylvekt komplekser av det PEGylerte FGF-21 polypeptidet som kan dannes når ublokkert PEG blir aktivert ved begge ender av molekylet, og derved kryssbinder FGF-21 polypeptidvariantmolekyler. Betingelsene i løpet av hydrofob vekselvirkningskromatografi er slik at fritt mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH strømmer gjennom kolonnen, mens hvilke som helst kryssbundne PEGylerte FGF-21 polypeptidvariantkomplekser eluerer etter de ønskede formene, som inneholder ett FGF-21 polypeptidvariantmolekyl konjugert til én eller flere PEG grupper. Egnede betingelser varierer avhengig av de relative størrelsene av de kryssbundne kompleksene versus de ønskede konjugatene og blir lett bestemt av fagpersonene. Eluenten inneholdende de ønskede konjugatene blir konsentrert ved ultrafiltrering og avsaltet ved diafiltrering.



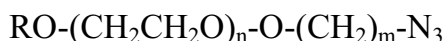
Hvis nødvendig, kan det PEGylerte FGF-21 polypeptidet oppnådd fra den hydrofobe kromatografien bli rensset videre ved én eller flere prosedyrer kjent for fagpersonene inkludert, men er ikke begrenset til, affinitetskromatografi; anion- eller kationbyttekromatografi (ved anvendelse av, inkludert men ikke begrenset til, DEAE SEPHAROSE); kromatografi på silika; omvendt fase HPLC; gelfiltrering (ved anvendelse av, inkludert men ikke begrenset til, SEPHADEX G-75); hydrofob vekselvirkningskromatografi; størrelsesutelukkeskromatografi, metall-chelat kromatografi; ultrafiltrering/diafiltrering; etanolutfelling; ammoniumsulfatutfelling; kromatofokusering; forskyvningskromatografi; elektroforetiske prosedyrer (inkludert men ikke begrenset til preparativ isoelektrisk fokusering), differensiell løselighet (inkludert men ikke begrenset til ammoniumsulfatutfelling) eller ekstraksjon. Tilsynelatende molekylvekt kan bli estimert ved GPC ved sammenligning med globulære proteinstandarder (Preneta, AZ i PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, red.) IRL Press 1989, 293-306). Renheten av FGF-21-PEG konjugatet kan bli analysert ved proteolytisk nedbrytning (inkludert men ikke begrenset til, trypsinspalting) fulgt av massespektrometrianalyse. Pepinsky RB., et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297(3):1059-66 (2001).

En vannløselig polymer knyttet til en aminosyre av et FGF-21 polypeptid ifølge oppfinnelsen kan bli videre derivatisert eller substituert uten begrensning.

### **Azid-holdige PEG-derivater**

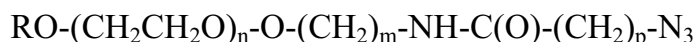
I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid modifisert med et PEG-derivat som inneholder en azid-andel som vil reagere med en alkyn-andel som foreligger på sidekjeden av den ikke-naturlig kodede aminosyren. Generelt, vil PEG-derivatene ha en gjennomsnittlig molekylvekt som spenner fra 1-100 kDa og, i noen utførelsesformer, fra 10-40 kDa.

I noen utførelsesformer, vil det azid-terminale PEG-derivatet ha strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10 og n er 100-1.000 (dvs. gjennomsnittlig molekylvekt er mellom 5-40 kDa).

I en annen utførelsesform, vil det azid-terminale PEG-derivatet ha strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10, p er 2-10 og n er 100-1.000 (dvs. gjennomsnittlig molekylvekt er mellom 5-40 kDa).

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid omfattende en alkyn-holdig aminosyre modifisert med et forgrenet PEG-derivat som inneholder en terminal azid-andel, hvor hver kjede av den forgrenede PEGen har en MW som spenner fra 10-40 kDa og kan være fra 5-20 kDa. For eksempel, i noen utførelsesformer, vil det azid-terminale PEG-derivatet ha den følgende strukturen:



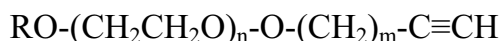
hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10, p er 2-10 og n er 100-1.000, og X er eventuelt en O, N, S eller karbonylgruppe (C=O), som i hvert tilfelle kan være til stede eller fraværende.

5

### **Alkyn-holdige PEG-derivater**

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid modifisert med et PEG-derivat som inneholder en alkyn-andel som vil reagere med en azid-andel som foreligger på sidekjeden av den ikke-naturlig kodede aminosyren.

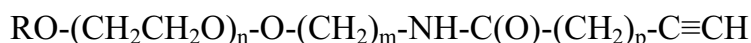
10 I noen utførelsesformer, vil det alkyn-terminale PEG-derivatet ha den følgende strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10 og n er 100-1.000 (dvs. gjennomsnittlig molekylvekt er mellom 5-40 kDa).

15 I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid omfattende en alkyn-holdig ikke-naturlig kodet aminosyre modifisert med et PEG-derivat som inneholder et terminalt azid eller terminal alkyn-andel som er knyttet til PEG-ryggraden ved hjelp av en amidbinding.

I noen utførelsesformer vil det alkyn-terminale PEG-derivatet ha den følgende  
20 strukturen:



hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10, p er 2-10 og n er 100-1.000.

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid omfattende en azid-holdig aminosyre modifisert med et forgrenet PEG-derivat som inneholder en  
25 terminal alkyn-andel, hvor hver kjede av den forgrenede PEG-en har en MW som spenner fra 10-40 kDa og kan være fra 5-20 kDa. For eksempel, i noen utførelsesformer, vil det alkyn-terminale PEG-derivatet ha den følgende strukturen:

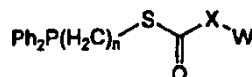


30 hvor R er en enkel alkyl (metyl, etyl, propyl, etc.), m er 2-10, p er 2-10, og n er 100-1.000, og X er eventuelt en O, N, S eller karbonylgruppe (C=O), eller ikke foreligger.

### **Fosfin-holdige PEG-derivater**

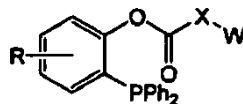
I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid modifisert med et PEG-derivat som inneholder en aktivert funksjonell gruppe (inkludert men ikke  
35 begrenset til, ester, karbonat) videre omfattende en aryl-fosfin-gruppe som vil reagere med en azid-andel som foreligger på sidekjeden av den ikke-naturlig kodede aminosyren. Generelt, vil PEG-derivatene ha en gjennomsnittlig molekylvekt som spenner fra 1-100 kDa og, i noen utførelsesformer, fra 10-40 kDa.

I noen utførelsesformer vil PEG-derivatet ha strukturen:



hvor n er 1-10; X kan være O, N, S eller ikke til stede, Ph er fenyl og W er en vannløselig polymer.

5 I noen utførelsesformer vil PEG-derivatet ha strukturen:



hvor X kan være O, N, S eller ikke til stede, Ph er fenyl, W er en vannløselig polymer og R kan være H, alkyl, aryl, substituert alkyl og substituerte arylgrupper. Eksempelvis R-grupper inkluderer men er ikke begrenset til -CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OR', -NR'R'', -SR', -halogen, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -CN og -NO<sub>2</sub>. R', R'', R''' og R'''' angir hver uavhengig hydrogen, substituert eller usubstituert heteroalkyl, substituert eller usubstituert aryl, inkludert men ikke begrenset til, aryl substituert med 1-3 halogener, substituerte eller usubstituerte alkyl-, alkoksy- eller tioalkoksygrupper, eller arylalkylgrupper. Når en forbindelse ifølge oppfinnelsen inkluderer mer enn én R-gruppe, for eksempel, er hver av R-gruppene uavhengig valgt som hver er R', R'', R''' og R'''' grupper når mer enn én av disse gruppene foreligger. Når R' og R'' er festet til det samme nitrogenatomet, kan de være kombinert med nitrogenatomet for å danne en 5-, 6-, eller 7-leddet ring. For eksempel er -NR'R'' ment å inkludere, men ikke være begrenset til, 1-pyrrolidinyl og 4-morfolinyl. Fra diskusjonen av substituenten over, vil en fagperson forstå at begrepet "alkyl" er ment å inkludere grupper som inkluderer karbonatomer bundet til grupper andre enn hydrogengrupper, så som haloalkyl (inkludert men ikke begrenset til, -CF<sub>3</sub> og -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) og acyl (inkludert men ikke begrenset til, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, og lignende).

## 25 Andre PEG-derivater og generelle PEGyleringsteknikker

Andre eksemplise PEG molekyler som kan være knyttet til FGF-21 polypeptider, så vel som PEGyleringsmetoder inkluderer, men er ikke begrenset til, de beskrevet i, f.eks. U.S. patentpublikasjon nr. 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 30 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/0086939; 2002/0082345; 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171; 2001/0044526; 2001/0021763; U.S. patent nr. 6,646,110; 5,824,778; 5,476,653; 5,219,564; 5,629,384; 5,736,625; 4,902,502; 5,281,698; 5,122,614; 5,473,034; 5,516,673; 35 5,382,657; 6,552,167; 6,610,281; 6,515,100; 6,461,603; 6,436,386; 6,214,966; 5,990,237; 5,900,461; 5,739,208; 5,672,662; 5,446,090; 5,808,096; 5,612,460; 5,324,844; 5,252,714; 6,420,339; 6,201,072; 6,451,346; 6,306,821; 5,559,213; 5,747,646; 5,834,594; 5,849,860;

5,980,948; 6,004,573; 6,129,912; WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 og EP 154 316. Et hvilket som helst av PEG molekylene beskrevet heri kan bli brukt i en hvilken som helst form, inkludert men ikke begrenset til, enkeltkjede, forgrenet kjede, multiarm-kjede, enkelt-funksjonell, bi-funksjonell, multi-funksjonell, eller en hvilken som helst kombinasjon derav.

Ytterligere polymer og PEG-derivater er beskrevet i de følgende patentsøknadene: U.S. patentpublikasjon nr. 2006/0194256, U.S. patentpublikasjon nr. 2006/0217532, U.S. patentpublikasjon nr. 2006/0217289, U.S. provisorisk patent nr. 60/755,338; U.S. provisorisk patent nr. 60/755,711; U.S. provisorisk patent nr. 60/755,018; Internasjonal patentsøknad nr. PCT/US06/49397; WO 2006/069246; U.S. provisorisk patent nr. 60/743,041; U.S. provisorisk patent nr. 60/743,040; Internasjonal patentsøknad nr. PCT/US06/47822; U.S. provisorisk patent nr. 60/882,819; U.S. provisorisk patent nr. 60/882,500; og U.S. provisorisk patent nr. 60/870,594.

### **Forsterking av affinitet for serumalbumin**

Ulike molekyler kan også bli kondensert til FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen for å modulere halveringstiden av FGF-21 polypeptider i serum. I noen utførelsesformer er molekyler knyttet eller kondensert til FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen for å forsterke affinitet for endogent serumalbumin i et dyr.

For eksempel, i noen tilfeller, blir det laget en rekombinant fusjon av et FGF-21 polypeptid og en albuminbindende sekvens. Eksempelvis albuminbindende sekvenser inkluderer, men er ikke begrenset til, det albuminbindende domenet fra streptococcal protein G (*se. f.eks.* Makrides et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:534-542 (1996) og Sjolander et al., J. Immunol. Methods 201:115-123 (1997)), eller albumin-bindende peptider så som de beskrevet i, f.eks. Dennis, et al., J. Biol. Chem. 277:35035-35043 (2002).

I andre utførelsesformer, blir FGF-21 polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse acylert med fettsyrer. I noen tilfeller, fremmer fettsyrene binding til serumalbumin. *Se, f.eks.* Kurtzhals, et al., Biochem. J. 312:725-731 (1995).

I andre utførelsesformer, blir FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen kondensert direkte med serumalbumin (inkludert men ikke begrenset til, humant serumalbumin). De med kunnskap innen faget vil erkjenne at en lang rekke andre molekyler også kan bli knyttet til FGF-21 i foreliggende oppfinnelse for å modulere binding til serumalbumin eller andre serumkomponenter.

## ***X. Glykosylering av FGF-21 polypeptider***

Oppfinnelsen inkluderer FGF-21 polypeptider som inkorporerer én eller flere ikke-naturlig kodede aminosyrer som bærer sakkardrester. Sakkardrestene kan være enten  
5 naturlig (inkludert men ikke begrenset til, N-acetylglukosamin) eller ikke-naturlige (inkludert men ikke begrenset til, 3-fluorgalaktose). Sakkardene kan være knyttet til de ikke-naturlig kodede aminosyrene enten ved en N- eller O-sammenføyde glykosidisk binding (inkludert men ikke begrenset til, N-acetylgalaktose-L-serin) eller en ikke-naturlig binding (inkludert men ikke begrenset til, et oksim eller det tilsvarende C- eller S-  
10 sammenføyde glykosid).

Sakkard- (inkludert men ikke begrenset til, glykosyl) andelene kan bli addert til FGF-21 polypeptider enten *in vivo* eller *in vitro*. I noen utførelsesformer av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid omfattende en karbonyl-holdig ikke-naturlig kodet aminosyre modifisert med et sakkard derivatisert med en aminooksygruppe for å generere det  
15 tilsvarende glykosylerte polypeptidet sammenføyde via en oksimbinding. Med én gang det er festet til den ikke-naturlig kodede aminosyren, kan sakkardet bli videre bearbeidet ved behandling med glykosyltransferaser og andre enzymer for å generere et oligosakkard bundet til FGF-21 polypeptidet. *Se, f.eks.* H. Liu, et al. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003).

I noen utførelsesformer av oppfinnelsen, blir et FGF-21 polypeptid omfattende en karbonyl-holdig ikke-naturlig kodet aminosyre modifisert direkte med et glykan med definert struktur fremstilt som et aminooksyderivat. En fagperson vil erkjenne at andre funksjonaliteter, inkludert azid, alkyn, hydrazid, hydrazin og semikarbazid, kan bli brukt  
20 for å knytte sakkardet til den ikke-naturlig kodede aminosyren.

I noen utførelsesformer av oppfinnelsen, kan et FGF-21 polypeptid omfattende en azid- eller alkynyl-holdig ikke-naturlig kodet aminosyre så bli modifisert ved, inkludert  
25 men ikke begrenset til, en Huisgen [3+2] sykloaddisjonsreaksjon med, inkludert men ikke begrenset til, henholdsvis alkynyl- eller azidderivater. Denne fremgangsmåten sørger for at proteiner blir modifisert med ekstremt høy selektivitet.

30

## ***XI. FGF-21 dimerer og multimerer***

Foreliggende oppfinnelse sørger også for FGF-21 og FGF-21 analoge kombinasjoner så som homodimerer, heterodimerer, homomultimerer eller heteromultimerer (dvs. trimerer, tetramerer, etc.) hvor FGF-21 inneholdende én eller flere ikke-naturlig kodede  
35 aminosyrer er bundet til en annen FGF-21 eller FGF-21 variant derav eller et hvilket som helst annet polypeptid som ikke er FGF-21 eller FGF-21 variant derav, enten direkte til polypeptidryggraden eller via en linker. På grunn av dens økede molekylvekt sammenlignet med monomerer, kan FGF-21 dimer- eller multimerkonjugatene utvise nye eller

ønskelige egenskaper, inkludert men ikke begrenset til forskjellig farmakologisk, farmakokinetisk, farmakodynamisk, modulert terapeutisk halveringstid, eller modulert plasma halveringstid i forhold til den monomere FGF-21. I noen utførelsesformer, vil FGF-21 dimerer ifølge oppfinnelsen modulere signaltransduksjon av FGF-21 reseptorer. I 5 andre utførelsesformer, vil FGF-21 dimerene eller multimerene ifølge foreliggende oppfinnelse virke som en FGF-21 reseptorantagonist, agonist eller modulator.

I noen utførelsesformer, vil ett eller flere av FGF-21 molekylene som foreligger i en FGF-21 inneholdende dimer eller multimer omfatte en ikke-naturlig kodet aminosyre knyttet til en vannløselig polymer.

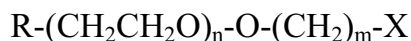
10 I noen utførelsesformer er FGF-21 polypeptidene sammenknyttet direkte, inkludert men ikke begrenset til, via en Asn-Lys amidbinding eller Cys-Cys disulfidbinding. I noen utførelsesformer, vil FGF-21 polypeptidene, og/eller det sammenknyttede ikke-FGF-21 molekylet, omfatte forskjellige ikke-naturlig kodede aminosyrer for å legge til rette for dimerisering, inkludert men ikke begrenset til, et alkyn i én ikke-naturlig kodet aminosyre 15 av et første FGF-21 polypeptid og et azid i en andre ikke-naturlig kodet aminosyre av et andre molekyl vil bli konjugert via en Huisgen [3+2] sykloaddisjon. Alternativt kan FGF-21, og/eller det sammenknyttede ikke-FGF-21 molekylet omfattende en keton-holdig ikke-naturlig kodet aminosyre være konjugert til et andre polypeptid omfattende en hydroksylamin-holdig ikke-naturlig kodet aminosyre og polypeptidene blir reagert via 20 dannelsen av det tilsvarende oksimet.

Alternativt blir de to FGF-21 polypeptidene, og/eller det sammenknyttede ikke-FGF-21 molekyl, sammenknyttet via en linker. En hvilken som helst hetero- eller homo-bifunksjonell linker kan bli brukt for å føye sammen de to molekylene, og/eller de sammenknyttede ikke-FGF-21 molekylene, som kan ha den samme eller forskjellig 25 primærsekvens. I noen tilfeller, kan linkeren brukt for å binde FGF-21en og/eller de sammenknyttede ikke-FGF-21 molekylene sammen være en bifunksjonell PEG reagens. Linkeren kan ha et vidt område av molekylvekt eller molekyllengde. Linkere med større eller mindre molekylvekt kan bli brukt for å tilveiebringe et ønsket romlig forhold eller konformasjon mellom FGF-21 og den sammenknyttede entiteten eller mellom FGF-21 og 30 dens reseptor, eller mellom den sammenknyttede entiteten og dens bindingspartner, hvis noen. Linkere som har lengre eller kortere molekyllengde kan også bli brukt for å tilveiebringe et ønsket rom eller fleksibilitet mellom FGF-21 og den sammenknyttede entiteten, eller mellom den sammenknyttede entiteten og dens bindingspartner, hvis noen.

I noen utførelsesformer, tilveiebringer oppfinnelsen vann-løselige bifunksjonelle 35 linkere som har en manualformet struktur som inkluderer: a) et azid, et alkyn, et hydrazin, et hydrazid, et hydroksylamin eller en karbonyl-holdig andel på minst en første ende av en polymerryggrad; og b) minst en andre funksjonelle gruppe på en andre ende av polymerryggraden. Den andre funksjonelle gruppen kan være den samme eller forskjellig som den første funksjonelle gruppen. Den andre funksjonelle gruppen, er i noen utførelsesformer,

ikke reaktiv med den første funksjonelle gruppen. Oppfinnelsen tilveiebringer, i noen utførelsesformer, vann-løselige forbindelser som omfatter minst én arm med en forgrenet molekylærstruktur. For eksempel, kan den forgrenede molekylærstrukturen være dendrittisk.

5 I noen utførelsesformer, tilveiebringer oppfinnelsen multimerer omfattende ett eller flere FGF-21 polypeptid(er), dannet ved reaksjoner med vannløselige aktiverte polymerer som har strukturen:



10 hvori n er fra omkring 5 til 3.000, m er 2-10, X kan være en azid-, en alkyn-, en hydrazin-, en hydrazid-, en aminoksygruppe, en hydroksylamin-, en acetyl- eller karbonyl-holdig andel, og R er en endedeckende gruppe, en funksjonell gruppe, eller en forlatende gruppe som kan være den samme eller forskjellig fra X. R kan være, for eksempel, en funksjonell gruppe valgt fra gruppen bestående av hydroksyl, beskyttet hydroksyl, alkoksyl, N-hydroksysuccinimidylester, 1-benzotriazolylester, N-hydroksysuccinimidylkarbonat, 1-  
15 benzotriazolylkarbonat, acetal, aldehyd, aldehydhydrater, alkenyl, akrylat, metakrylat, akrylamid, aktivt sulfon, amin, aminoksy, beskyttet amin, hydrazid, beskyttet hydrazid, beskyttet tiol, karboksylsyre, beskyttet karboksylsyre, isocyanat, isotiocyanat, maleimid, vinylsulfon, ditiopyridin, vinylpyridin, jodacetamid, epoksid, glyoksaler, dioner, mesylater, tosylater, og tresylat, alken og keton.

20

## ***XII. Måling av FGF-21 polypeptidaktivitet og affinitet av FGF-21 polypeptid for FGF-21 polypeptidreseptoren***

FGF-21 har blitt vist å stimulere glukoseopptak og forsterke insulinsensitivitet i 3T3-L1 adipocytter, en in vitro modell utnyttet for studien av fettholdig vevsmetabolisme  
25 som vist i Eksempel 3 ifølge U.S. patentpublikasjon nr. 20040259780. En karakteristikk ved Type 2 diabetes er mangelen på glukoseopptak i ulike vevstyper inkludert fettholdig vev. Derfor er FGF-21 nyttig for behandling av Type 2 diabetes ved å senke blodglukose-nivåer. Dessuten er FGF-21 nyttig for behandling av obesitet ved å øke energiforbruk ved raskere og mer effektiv glukoseutnyttelse. I tillegg har FGF-21 blitt vist å stimulere  
30 glukoseopptak i 3T3-L1 adipocytter på en insulinuavhengig måte, noe som indikerer at den er nyttig også for å behandle Type 1 diabetes. Se U.S. patentpublikasjon nr. 20040259780. FGF-21 er vist å stimulere glukoseopptak i 3T3-L1 adipocytter på en konsentrasjonsavhengig måte ved en sub-optimal konsentrasjon av insulin (5 nM) og i fraværet av insulin i U.S. patentpublikasjon nr. 20040259780. I tillegg induserer FGF-21  
35 glukoseopptak i en ex vivo vevsmodell, beskrevet i U.S. patentpublikasjon nr. 20040259780.

Glukoseopptak i 3T3-L1 adipocytter kan bli vurdert ved anvendelse av den følgende fremgangsmåten. 3T3-L1 celler blir oppnådd fra the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.). Celler blir kultivert i vekstmedium (GM) inneholdende 10 %

jern-anrikt føtalt bovint serum i Dulbeccos modifiserte Eagles medium. For standard adipocyttdifferensiering, 2 dager etter at celler nådde konfluens (referert som dag 0), blir celler eksponert for differensieringsmedium (DM) inneholdende 10 % føtalt bovint serum, 10 µg/ml insulin, 1 µM deksametason og 0,5 µM isobutylmetylksantin, i 48 timer. Celler blir så opprettholdt i post-differensieringsmedium inneholdende 10 % føtalt bovint serum og 10 µg/ml av insulin. In vitro potens kan bli målt med glukoseopptaksanalysen som er kjent for fagpersonene. In vitro potens kan bli definert som målet av glukoseopptak av en FGF-21 forbindelse i en celle-basert analyse og er et mål for den biologiske potensen av FGF forbindelsen. Det kan bli uttrykt som EC<sub>50</sub>-en som er den effektive konsentrasjonen av forbindelse som resulterer i 50 % aktivitet i et enkelt-dose-respons eksperiment.

Glukosetransportanalyse-insulinavhengig-heksoseopptak, som analysert ved akkumuleringen av 0,1 mM 2-deoksy-D-[<sup>14</sup>C]glukose, blir målt som følger: 3T3-L1 adipocytter i 12-brønnplater blir vasket to ganger med KRP buffer (136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 10 mM NaPO<sub>4</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,9 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,4) varmet til 37 °C og inneholdende 0,2 % BSA, inkubert i Leibovitz' L-15 medium inneholdende 0,2 % BSA i 2 timer ved 37 °C i romluft, vasket to ganger igjen med KRP inneholdende, 0,2 % BSA buffer, og inkubert i KRP, 0,2 % BSA buffer i fraværet (Me<sub>2</sub>SO bare) eller nærværet av wortmannin i 30 minutter ved 37 °C i romluft. Insulin blir så tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 100 nM i 15 minutter, og opptaket av 2-deoksy-D-[<sup>14</sup>C]glukose blir målt de siste 4 minuttene. Ikke-spesifikt opptak, målt i nærvær av 10 µM cytochalasin B, blir subtrahert fra alle verdiene. Proteinkonsentrasjoner blir bestemt med Pierce bicinchoninic syre analysen. Opptak blir målt rutinemessig i triplikat eller kvadruplikat for hvert eksperiment. Virkningen av akutt og kronisk forbehandling av 3T3-L1 adipocytter med FGF-21 i nærvær av insulin kan bli undersøkt.

Glukosetransportanalyse-insulinuavhengig-3T3-L1 fibroblast blir plettet i 96-brønnplater og differensiert inn i fettceller (adipocytter) i 2 uker. Etter differensiering blir de sultet i serum-fritt medium og behandlet med FGF-21 i 24 timer. Etter behandling, blir celler vasket to ganger med KRBH buffer, inneholdende 0,1 % BSA. Glukoseopptak blir utført i nærvær av merket glukose (uten insulin) i KPBH buffer. FGF-21 har blitt vist å stimulere glukoseopptak i 3T3-L1 adipocytter på en konsentrasjonsavhengig måte ved en sub-optimal konsentrasjon av insulin (5 nM) og i fraværet av insulin (se US patentpublikasjon nr. 2004259780). I tillegg kan FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse bli vist å inducere glukoseopptak i en ex vivo vevsmodell.

I ex vivo glukosetransportmodellen, blir glukosetransportanalysen beskrevet som følger: Krebs-Henseleit buffer bruksløsninger-Stock 1: NaCl (1,16 M); KCl (0,046 M); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,0116 M); NaHCO<sub>3</sub> (0,0253 M). Stock 2: CaCl<sub>2</sub> (0,025 M); MgSO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O) (0,0116 M). BSA: Bruk ICN Cohn fraksjon V, fettsyrefritt BSA direkte uten dialysebehandling. Mediefremstilling: Tilsett 50 ml av Krebs stock 1 til 395 ml dH<sub>2</sub>O og gass med 95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub> i 1 time. Tilsett 50 ml stock 2 og bring til 500 ml med dH<sub>2</sub>O.



Tilsett 500 mg ICN fettstoffsrefritt BSA. Preinkuberings- og inkuberingsmedier: 32 mM mannitol, 8 mM glukose. Vaskemedier: 40 mM mannitol, 2 mM pyruvat. Transportmedier: 39 mM mannitol, 1 mM 2-DG; 32 mM mannitol, 8 mM 3-O-MG. Insulinløsning: (Svineinsulin [Lilly] 100.000.000  $\mu$ U/ml) ved en sluttkonsentrasjon på 2000  $\mu$ U/ml eller  
5 13,3 nM. Fremstilling av radioaktive merkemedier: Spesifikke aktiviteter brukt: 2DG=1,5 mCi/ml; 3-O-G=437  $\mu$ Ci/ml; eller, mannitol=8  $\mu$ Ci/m. Rotter blir bedøvet med 0,1 cc nembutal per 100 g kroppsvekt. Muskelvev blir skåret ut og renses i 0,9 % saltløsning så plassert i pre-inkuberingsmedier (2 ml) ved 29 °C i 1 time. Muskelvevet blir overført til inkuberingsmedier (2 ml; samme som pre-inkubering unntatt inkludert insulin eller  
10 testforbindelse) og inkubert i 30 minutter (avhenger av eksperimentelle betingelser). Muskelvevet blir så overført til vaskemedier (2 ml) i 10 minutter ved 29 °C, så overført til merkemedier (1,5 ml) i 10 min (3-O-MG) eller 20 min (2DG). Muskelvevet blir trimmet, veid og plassert i polypropylenrør på tørris. 1 ml 1 N KOH blir tilsatt til rørene som så blir plassert i et 70 °C vannbad i 10-15 minutter, rørene virvles med få minutters mellomrom.  
15 Rørene blir avkjølt på is og 1 ml 1 N HCl blir tilsatt, så blandet godt. 200  $\mu$ l supernatant blir så plassert i duplikate scintillasjonsvialer og talt på en scintillasjonsteller sammenlignet med kjente radioaktive standarder.

For kontraksjon blir musklene først inkubert i 1 time i preinkuberings-/inkuberingsmedier. Etter 1 time, blir én muskel av hvert par (ett par per rotte) stiftet til  
20 stimuleringsapparatet og den andre muskelen blir overført til en ny kolbe med inkuberingsmedier. Den sammentrukne muskelen blir stimulert ved 200 msec serier av 70 Hz hvor hver impuls i en serie er 0,1 msec. Seriene blir levert ved 1/sek ved 10-15 V i 2x10 minutter med en 1 minutt hvile i mellom. Ved slutten av stimuleringsperioden, blir muskelen fjernet fra stimuleringsapparatet og plassert i vaskemedier i 10 minutter, fulgt  
25 av merkemedier som skissert over.

FGF-reseptoren kan bli fremstilt ved anvendelse av teknikker og fremgangsmåter som er kjent for en fagperson. FGF-21 polypeptidaktivitet kan bli bestemt ved anvendelse av standard eller kjente *in vitro* eller *in vivo* undersøkelser. For et ikke-PEGylert eller PEGylert FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig aminosyre, kan affiniteten av  
30 FGF-21 for dens reseptor bli målt ved anvendelse av en BIAcore™ biosensor (Pharmacia).

Uavhengig av hvilke fremgangsmåter som blir brukt for å danne FGF-21 polypeptidene, blir FGF-21 polypeptidene utsatt for undersøkelser for biologisk aktivitet. Generelt, skulle testen for biologisk aktivitet tilveiebringe analyse for det ønskede  
35 resultatet, så som økning eller reduksjon av biologisk aktivitet (sammenlignet med modifisert FGF-21), forskjellig biologisk aktivitet (sammenlignet med modifisert FGF-21), reseptor eller bindingspartneraffinitetsanalyse, konformasjonsmessige eller strukturelle forandringer av selve FGF-21en eller dens reseptor (sammenlignet med den modifiserte FGF-21), eller serum-halveringstidsanalyse.

Sammenstillingen over av referanser for analysemetodologier er ikke uttømmende, og fagpersonene vil erkjenne andre undersøkelser nyttige for testing for det ønskede sluttresultatet.

5 ***XIII. Måling av potens, funksjonell in vivo halveringstid og farmakokinetiske parametere***

Et viktig aspekt ifølge oppfinnelsen er den forlengede biologiske halveringstiden som blir oppnådd ved konstruksjon av FGF-21 polypeptidet med konjugering av polypeptidet til en vannløselig polymerandel. Den hurtige post-administrasjon-  
10 reduksjonen av FGF-21 polypeptidserumkonsentrasjoner har gjort det viktig å evaluere biologiske responser til behandling med konjugert og ikke-konjugert FGF-21 polypeptid og varianter derav. Det konjugerte og ikke-konjugerte FGF-21 polypeptidet og varianter derav ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha forlengede serum halveringstider også etter administrasjon via, f.eks. subkutan eller i.v. administrasjon, som gjør den mulig å måle  
15 ved, f.eks. ELISA metode eller ved en primær screening analyse. ELISA eller RIA kits fra kommersielle kilder kan bli brukt. Måling av in vivo biologisk halveringstid blir utført som beskrevet heri.

Potensen og den funksjonelle in vivo halveringstiden av et FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre kan bli bestemt ifølge protokoller kjent for  
20 fagpersonene.

Farmakokinetiske parametere for et FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre kan bli evaluert i normale Sprague-Dawley hannrotter (N=5 dyr per behandlingsgruppe). Dyr vil motta enten en enkeltdose på 25 ug/rotte iv eller 50 ug/rotte sc, og omtrent 5-7 blodprøver vil bli tatt ifølge et forhåndsdefinert tidsforløp, som  
25 generelt dekker omkring 6 timer for et FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre ikke konjugert til en vannløselig polymer og omkring 4 dager for et FGF-21 polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre og konjugert til en vannløselig polymer. Farmakokinetiske data for FGF-21 uten en ikke-naturlig kodet aminosyre kan bli sammenlignet direkte med dataene oppnådd for FGF-21 polypeptider  
30 omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre.

Farmakokinetiske parametere kan også bli evaluert i en primat, f.eks. makakaper. Typisk blir en enkelt injeksjon administrert enten subkutan eller intravenøst, og serum FGF-21 nivåer blir overvåket over tid.

Den spesifikke aktiviteten av FGF-21 polypeptider i samsvar med denne opp-  
35 finnelsen kan bli bestemt ved ulike undersøkelser kjent innen faget. Den biologiske aktiviteten av FGF-21 polypeptidmoteinene, eller fragmenter derav, oppnådd og rensset i samsvar med denne oppfinnelsen kan bli testet ved fremgangsmåter beskrevet eller referert heri eller kjent for fagpersonene.

Polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli brukt for å behandle pattedyr som lider av ikke-insulinavhengig diabetes mellitus (NIDDM: Type 2), insulinavhengig diabetes (Type 1), så vel som obesitet, utilstrekkelig glukoseclearance, hyperglykemi, hyperinsulinemi og lignende. FGF-21 er effektiv i dyremodeller av diabetes og obesitet, som vist i US patentpublikasjon nr. 20040259780. Ettersom metabolske profiler avviker blant ulike dyremodeller av obesitet og diabetes, har analyse av mange modeller blitt foretatt for å skille virkningene av hyperinsulinemi, hyperglykemi og obesitet. De diabetesrammede (db/db) og overvektige (ob/ob) musene er karakterisert ved massiv obesitet, hyperfagi, variabel hyperglykemi, insulinresistens, hyperinsulinemi og svekket termogenese (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, i Diabetes Mellitus; H. Rifkin og D. Porte, Jr. red. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, utg. 4, 1990), s. 299-340). Diabetes er imidlertid mye mer alvorlig i db/db modellen (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, i Diabetes Mellitus; H. Rifkin og D. Porte, Jr. red. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), s. 299-340). Zucker (fa/fa) rotter er alvorlig overvektige, hyperinsulinemiske og insulinresistente (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, i Diabetes Mellitus; H. Rifkin og D. Porte, Jr. red. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, red. 4, 1990), s. 299-340), og fa/fa mutasjonen kan være rottekvivalenten av den murine db mutasjon (Friedman et al., Cell 69:217-220, 1992; Truett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7806, 1991). Tubby (tub/tub) mus er karakterisert ved obesitet, moderat insulinresistens og hyperinsulinemi uten signifikant hyperglykemi (Coleman et al., J. Heredity 81:424, 1990).

Mononatriumglutamat (MSG) modellen for kjemisk-indusert obesitet (Olney, Science 164:719, 1969; Cameron et al., Cli. Exp. Pharmacol. Physiol. 5:41, 1978), hvor obesitet er mindre alvorlig enn i de genetiske modellene og utvikles uten hyperfagi, hyperinsulinemi og insulinresistens, kan også bli gransket. Til slutt kan streptozotocin (STZ) modellen for kjemisk-indusert diabetes bli testet for å undersøke virkningene av hyperglykemi i fraværet av obesitet. STZ-behandlede dyr mangler insulin og er alvorlig hyperglykemiske (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, i Diabetes Mellitus; H. Rifkin og D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, red. 4, 1990), s. 299-340).

FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen kan bli evaluert i en in vivo septisk sjokk modell i ob/ob mus. Se U.S. patentpublikasjon nr. 20050176631.

#### ***XIV. Administrasjon og farmasøytiske sammensetninger***

Polypeptidene eller proteinene ifølge oppfinnelsen (inkludert men ikke begrenset til, FGF-21, syntetaser, proteiner omfattende én eller flere unaturlig aminosyre, etc.) blir eventuelt anvendt for terapeutiske anvendelser, inkludert men ikke begrenset til, i kombinasjon med en egnet farmasøytisk bærer. Slike sammensetninger omfatter for eksempel, en terapeutisk effektiv mengde av forbindelsen, og en farmasøytisk akseptabel

bærer eller eksipiens. En slik bærer eller eksipiens inkluderer, men er ikke begrenset til, saltløsning, bufret saltløsning, dekstrose, vann, glyserol, etanol og/eller kombinasjoner derav. Formuleringen blir laget for å passe administrasjonsmåten. Generelt, er fremgangsmåter for administrering av proteiner kjent for fagpersonene og kan bli utøvet for administrasjon av polypeptidene ifølge oppfinnelsen.

Terapeutiske sammensetninger omfattende ett eller flere polypeptid ifølge oppfinnelsen blir eventuelt testet i én eller flere passende in vitro og/eller in vivo dyremodeller av sykdom, for å avpasse virksomhet, vevsmetabolisme, og å estimere doseringer, ifølge fremgangsmåter kjent for fagpersonene. Spesielt, kan doseringer bli innledende bestemt ved aktivitet, stabilitet eller andre egnede mål av unaturlige heri til naturlige aminosyrehomologer (inkludert men ikke begrenset til, sammenligning av et FGF-21 polypeptid modifisert til å inkludere én eller flere unaturlige aminosyrer til et naturlig aminosyre FGF-21 polypeptid), dvs. i en relevant analyse.

Administrasjon er ved en hvilken som helst av rutene normalt brukt for å introdusere et molekyl til endelig kontakt med blod eller vevsceller. De unaturlig aminosyre polypeptidene ifølge oppfinnelsen blir administrert på en hvilken som helst egnet måte, eventuelt med én eller flere farmasøytisk akseptable bærere. Egnede fremgangsmåter for administrering av slike polypeptider i konteksten ifølge foreliggende oppfinnelse til en pasient er tilgjengelige, og, selv om mer enn én rute kan bli brukt for å administrere en spesiell sammensetning, kan en spesiell rute ofte tilveiebringe en mer umiddelbar og mer effektiv virkning eller reaksjon enn en annen rute.

Farmasøytisk akseptable bærere blir bestemt delvis ved den spesielle sammensetningen som blir administrert, så vel som ved den spesielle fremgangsmåten brukt for å administrere sammensetningen. Det er følgelig en lang rekke egnede formuleringer av farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse.

FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen kan bli administrert ved en hvilken som helst konvensjonell rute egnet for proteiner eller peptider, inkludert, men ikke begrenset til parenteralt, f.eks. injeksjoner inkludert, men ikke begrenset til, subkutant eller intravenøst eller en hvilken som helst annen form for injeksjoner eller infusjoner.

Polypeptidsammensetninger kan bli administrert ved flere ruter inkludert, men ikke begrenset til orale, intravenøse, intraperitoneale, intramuskulære, transdermale, subkutane, topiske, sublingvale eller rektale måter. Sammensetninger omfattende ikke-naturlig aminosyre polypeptider, modifisert eller umodifisert, kan også bli administrert via liposomer. Slike administrasjonsruter og passende formuleringer er generelt kjent for fagpersonene. FGF-21 polypeptidet, kan bli brukt alene eller i kombinasjon med andre egnede komponenter så som en farmasøytisk bærer. FGF-21 polypeptidet kan bli brukt i kombinasjon med andre midler, inkludert men ikke begrenset til, et oralt anti-diabetisk middel.

Begrepet "anti-diabetisk middel" skal bety et hvilket som helst legemiddel som er nyttig for å behandle, forhindre eller på annen måte redusere alvorlighetsgraden av en hvilken som helst glukosemetabolismeforstyrrelse, eller hvilke som helst komplikasjoner derav, inkludert en hvilken som helst av tilstandene, sykdom eller komplikasjonene beskrevet heri. Anti-diabetiske midler inkluderer insulin, tiazolidindioner, sulfonylureaer, benzosyrederivater, alfa-glukosidaseinhibitorer eller lignende. Andre generelle kategorier av anti-diabetiske midler som kan være del av en underlagt sammensetning inkluderer (med definerte begreper i anførselstegn): "legemiddelartikler" erkjent i den offisielle United States Pharmacopoeia eller offisielle National Formulary (eller et hvilket som helst tillegg til disse); "nytt legemiddel" og "nytt dyrelegemiddel" godkjent av FDA i U.S.A. slik de begrepene blir brukt i Title 21 av the United States Code; et hvilket som helst legemiddel som krever godkjenning av en myndighetsenhet, i U.S.A. eller utlandet ("godkjent legemiddel"); et hvilket som helst legemiddel som det er nødvendig å oppnå regulatorisk godkjenning for, for å etterkomme 21 U.S.C. .sectn.355(a) ("regulatorisk godkjent legemiddel"); et hvilket som helst middel som blir eller ble underkastet en humanlegemiddelsøknad under 21 U.S.C..sectn.379(g) ("humant legemiddel"). (Alle referanser til lovsamling for denne definisjonen angir slik lov som på den opprinnelig innleveringsdatoen for denne søknaden.) Andre anti-diabetiske midler er vist heri, og er kjent for fagpersonene. Dagens legemidler eller anti-diabetiske midler brukt for å ta hånd om Type 2 diabetes som er velkjent innen faget inkluderer flere kategorier: biguanidene, tiazolidindioner, sulfonylureaene, benzosyrederivater og glukosidaseinhibitorer. Disse legemidlene har vanligvis distinkte virkningsmåter. Biguanidene, f.eks. metformin, antas å forhindre overdreven hepatisk glukoneogenese. Tiazolidindionene antas å virke ved å øke raten av perifer glukosefjerning. Sulfonylureaene, f.eks. tolbutamid og glyburid, og benzosyrederivatene, f.eks. repaglinid, senker plasmaglukose ved å stimulere insulinsekresjon. Alfa-glukosidaseinhibitorer inhiberer konkurrerende alfa-glukosidase, som metaboliserer karbohydrater, og forsinker derved karbohydratabsorpsjon og minsker postprandial hyperglykemi. I tillegg, er det flere foreslåtte terapier for behandling av diabetes som enda ikke har blitt godkjent for human anvendelse.

Dagens legemidler eller anti-diabetiske midler brukt for å ta hånd om diabetes og dets forstadiesyndromer, så som insulinresistens, som er velkjent innen faget inkluderer fem klasser av forbindelser: biguanidene, f.eks. metformin; tiazolidindioner; sulfonylureaene, f.eks. tolbutamid og glyburid; benzosyrederivater, f.eks. repaglinid; og glukosidaseinhibitorer. I tillegg til disse midlene, kan flere andre terapier bli brukt i kombinasjon med FGF-21 polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse for å forbedre glukosekontroll, inkludert men ikke begrenset til DPP-4 inhibitorer. Visse av disse anti-diabetiske midlene har blitt godkjent for human bruk. De ledende DPP-4 forbindelsene testet i kliniske forsøk inkluderer Vildagliptin (Galvus) (LAF237), Sitagliptin (Januvia), Saxagliptin og Alogliptin. Januvia (Sitagliptin) ble godkjent for behandlingen av type 2

diabetes i USA 17. okt 2006, for bruk som monoterapi, eller kombinasjonsterapi, med enten metformin eller et tiazolidindion. Administrasjon av den første generasjons Novartis forbindelse 1-[[[2-[(5-cyanopyridin-2-yl)amino] etyl]amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidin (NVP DPP728) over en 4 ukers periode til 93 pasienter med Type 2 diabetes (midlere HbA1c på 7,4 %) reduserte nivåer av plasmaglukose, insulin og HbA1c over den 4 ukers studieperioden. Se Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV Improves Metabolic Control Over a 4-Week Study Period in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2002 Mai; 25(S) : 869-875. Pasienter som mottar metformin har også blitt anført å utvise additive glukosesenkende fordeler etter iverksettelse av GLP-1 terapi. Se Additive glucose-lowering effects of glucagon-like peptid-1 and metformin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001 Apr;24(4):720-5. I en studie av 10 overvektige ikke-diabetiske mannlige pasienter, ble metforminadministrasjon assosiert med økede nivåer av sirkulerende GLP-1 etter oral glukose-forsyning, og i eksperimenter ved anvendelse av poollet humant plasma, inhiberte metformin (0,1-0,5 mikrog/ml) signifikant nedbrytning av GLP-1(7-36)amid etter en 30-min inkubering ved 37 grader C, i nærvær eller fravær av DPP-4. Forfatterne av denne studien fremsatte muligheten for at metformin kan inhibere den enzymatiske nedbrytningen av GLP-1 både *in vitro* og *in vivo*. Se Effect of metformin on glucagon-like peptid 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. 2001 Mar; 24(3):489-94. Analyse av forholdet mellom DPP-4 og GLP-1 nedbrytning ved anvendelse av biokjemiske analyser *in vitro*. Demuth og kolleger fant ingen effekt av metformin på den DPP-4-medierte nedbrytningen av GLP-1 ved anvendelse av et mangfold av kilder av human DPP-4. Se Metformin Effects on Dipeptidylpeptidase IV Degradation of Glukagon-like Peptide-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar 15;291(5):1302-8.

Blant biguanider nyttige som diabetiske terapeutiske midler, har metformin vist seg spesielt vellykket. Metformin (N,N-dimetylimidodikarbonimididamid; 1,1-dimetylbiguanid; N,N-dimetylbiguanid; N,N-dimetyldiguanid; N'-dimetylguanylguanidin) er et anti-diabetisk middel som virker ved å redusere glukoseproduksjon ved leveren og ved å senke intestinal absorpsjon av glukose. Det antas også å forbedre insulinsensitiviteten av vev andre steder i kroppen (øker perifert glukoseopptak og utnyttelse). Metformin forbedrer glukosetoleranse i subjekter med svekket glukosetoleranse (IGT) og Type 2 diabetiske subjekter, ved å senke både pre- og post-prandial plasmaglukose. Metformin er generelt ikke effektivt i fravær av insulin. Bailey, *Diabetes Care* 15:755-72 (1992).

Virksomheten av metformin har blitt vist i flere forsøk. I én studie av moderat overvektige Type 2 diabetikere, ble HbA1c nivåer forbedret fra 8,6 % til 7,1 % etter 29 uker med metforminterapi alene eller i kombinasjon med sulfonyleurea. DeFronzo et al., *New Engl. J. Med.* 333:541-49 (1995). Metformin hadde også en gunstig effekt på serumlipider, ved å senke midlere fastende serumtriglyserider, totalt kolesterol og LDL kolesterolnivåer og viser ingen ugunstige virkninger på andre lipidnivåer. I et annet

forsøk, forbedret metformin glykemisk kontroll i NIDDM subjekter på en dose-relatert måte. Etter 14 uker, hadde metformin 500 og 2000 mg daglig redusert HbA1c med henholdsvis 0,9 % og 2,0 %. Garber et al., *Am J. Med.* 102: 491-97 (1997). Metformin kan også ha en fordelaktig terapeutisk effekt på insulinresistente ikke-diabetikere. Én studie indikerte at behandling av hypertensive overvektige ikke-diabetiske kvinner med metformin reduserte blodtrykk, fastende og glukose-stimulert plasmainsulin fibrinogen. Giugliano et al., *Diabetes Care* 16:1387-90 (1993).

Metformin blir vanligvis administrert som metformin HCl. Dette så vel som alle andre nyttige former av metformin blir vurdert for bruk med FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse. Generelt blir et fiksert doseringsregime individualisert for å ta hånd om hyperglykemi i diabetes med metformin HCl eller et hvilket som helst annet farmakologisk middel. Individualisering av dosering blir gjort på grunnlaget av både effektivitet og toleranse, mens den generelt ikke overstiger den maksimale anbefalte daglige dose på 2550 mg.

Tiazolidindioner vurdert for bruk i den praktiske utøvelse av foreliggende oppfinnelse inkluderer troglitazon og lignende. Slike forbindelser er velkjent, f.eks. som beskrevet i U.S. pat. nr. 5,223,522, 5,132,317, 5,120,754, 5,061,717, 4,897,405, 4,873,255, 4,687,777, 4,572,912, 4,287,200 og 5,002,953; og *Current Pharmaceutical Design* 2:85-101 (1996). Troglitazon er et oralt antihyperglykemisk middel som øker glukosetransport muligens ved aktivering av peroksisom proliferator-aktivert reseptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Ved slik aktivering, kan troglitazon forsterke ekspresjon av GLUT4 glukose transportere, som resulterer i øket insulin-stimulert glukoseopptak. Troglitazon kan også minske glukoneogenese og/eller aktivering av glykolyse.

HbA1c er en blodtest som måler mengden glykosylert som generelt er høyere når en pasient har opplevd perioder med øket blodglukose. Testen tilveiebringer et estimat av de siste 2-3 måneder av diabetesbehandling for en pasient. Glykemisk kontroll som resulterer fra troglitazonterapi reduserer HbA1c med omtrent 1 til 2 %. Mimura et al., *Diabetes Med.* 11:685-91 (1994); Kumar et al., *Diabetologia* 39:701-09 (1996). Virkninger trenger ikke inntreffe før noen få uker etter begynnelse av terapi. Troglitazon kan også redusere insulinkravene. I ett forsøk av pasienter med NIDDM og ved anvendelse av eksogent insulin, falt midlere HbA1c med 0,8 % og 1,4 % for doser på henholdsvis 200 og 600 mg troglitazon. Insulinkravene ble redusert med opp til 29 %. Schwartz et al., *New Engl. J. Med.* 338:861-66 (1998). I en annen studie av NIDDM diabetikere som bruker 400 og 600 mg troglitazon, ble fastende og post-prandiale glukosenivåer redusert, og hyperinsulinemisk euglykemisk clamp indikerte at glukosefjerning var omtrent 45 % over forbehandlingsnivåer. Maggs et al., *Ann. Intern. Med.* 128:176-85 (1998).

I én studie, øket 400 mg av troglitazon glukosefjernelsesrater i overvektige pasienter med enten svekket eller normal glukosetoleranse. Nolan et al., *New Eng. J. Med*

331:1188-93 (1994). I en annen studie av kvinner med IGT og en historie med svangerskapsdiabetes, forbedret 600 mg troglitazon insulinhomeostase, inkludert å forbedre insulinsensitivitet og senke sirkulerende insulinkonsentrasjoner, men glukosetoleranse var uendret. Berkowitz et al., *Diabetes* 45:172-79 (1996). Tiazolidindioner kan bli brukt med 5 populasjoner med risiko for NIDDM, så som kvinner med POCS eller GDM, for å forhindre eller forsinke inntreden av NIDDM. U.S. pat. nr. 5,874,454. Effektive mengder av troglitazon, når brukt alene, spenner fra omkring 10 mg opp til omkring 800 mg per daglige dose og et sammenlignbart område blir vurdert for bruk i foreliggende oppfinnelse. I tillegg til å bli brukt med metformin, kan troglitazon bli brukt i 10 kombinasjon med insulin og et sulfonylureamid. Se, for eksempel, U.S. pat. nr. 5,859,037.

Sulfonylureaer opererer generelt ved å senke plasmaglukose ved å øke frigivelsen av insulin fra bukspyttkjertelen. Spesifikt, virker sulfonylureaer ved å blokkere de ATP-sensitive kaliumkanalene. Sulfonylureaen glimepirid kan også øke insulinsensitivitet ved 15 å stimulere translokasjon av GLUT4 transportere. Sulfonylureaer blir typisk foreskrevet når HbA1c er over 8 %. Se også U.S. pat. nr. 5,258,185, 4,873,080.

Sulfonylureaene er en klasse av forbindelser som er velkjent innen faget, f.eks. som beskrevet i U.S. pat. nr. 3,454,635, 3,669,966, 2,968,158, 3,501,495, 3,708,486, 3,668,215, 3,654,357 og 3,097,242. Eksempelvis sulfonylureaer vurdert for bruk i visse 20 utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse (med typiske daglig doseringer indikert i parenteser) inkluderer acetoheksamid (i området på omkring 250 opp til omkring 1500 mg), klorpropamid (i området på omkring 100 opp til omkring 500 mg), tolazimid (i området på omkring 100 opp til omkring 1000 mg), tolbutamid (i området på omkring 500 opp til omkring 3000 mg), gliklazid (i området på omkring 80 opp til omkring 320 25 mg), glipizid (i området på omkring 5 opp til omkring 40 mg), glipizid GITS (i området på omkring 5 opp til omkring 20 mg), glyburid (i området på omkring 1 opp til omkring 20 mg), mikronisert glyburid (i området på omkring 0,75 opp til omkring 12 mg), glimeperid (i området på omkring 1 opp til omkring 8 mg), AG-EE 623 ZW og lignende. Glimepirid er det første anti-diabetiske middel i denne klassen som ble godkjent for bruk 30 med insulin, og det kan være mindre risiko for hypoglykemi assosiert med dets bruk.

Et mangfold av alfa-glukosidaseinhibitorer kan bli brukt med foreliggende oppfinnelse for å behandle og/eller forhindre diabetes. Slike inhibitorer inhiberer konkurrerende alfa-glukosidase, som metaboliserer karbohydrater, og forsinke derved karbohydratabsorpsjon og minsker post-prandial hyperglykemi. Clissod et al., *Drugs* 35:214-23 (1988). Reduksjonen i glukose kan bli vist ved reduserte HbA1c nivåer. 35 Eksempelvis alfa-glukosidaseinhibitorer vurdert for bruk i den praktiske utøvelse av foreliggende oppfinnelse inkluderer akarbose, miglitol og lignende. Effektive doseringer av både akarbose og miglitol er i området fra omkring 25 opp til omkring 300 mg daglig.



Alfa-glukosidaseinhibitorer kan bli brukt med polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse i kombinasjon med sulfonylureaer. Alfa-glukosidaseinhibitorer i kombinasjon med sulfonylureaer alene har blitt vist å redusere HbA1c nivåer generelt, fra omkring 0,5 til 1,0 %. I tillegg har alfa-glukosidaseinhibitorer blitt vist å være effektive ved å redusere den post-prandiale økningen i blodglukose. Lefevre et al., *Drugs* 44:29-38 (1992).

Et mangfold av benzosyrederivater kan bli brukt med polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse for å behandle og/eller forhindre diabetes. Disse midlene, også kjent som meglitinider, er ikke-sulfonylurea hypoglykemiske midler som har insulinsekretorisk kapasitet. For eksempel synes repaglinid å binde til ATP-sensitive kaliumkanaler på pankreatiske beta-celler og øker derved insulinsekresjon. Eksempelvis benzosyrederivater vurdert for bruk i den praktiske utøvelse av foreliggende oppfinnelse inkluderer repaglinid og lignende. For repaglinid, kan den effektive daglige doseringen være i området fra omkring 0,5 mg opp til omkring 16 mg, og midlet kan bli tatt før hvert måltid.

Flere midler er for tiden under undersøkelse som potensielle anti-diabetika i mennesker. Et hvilket som helst av slike midler kan bli brukt med polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse for behandling og/eller forhindring av metabolske lidelser, og spesielt av diabetes, hvis de blir tilgjengelige for terapeutisk bruk.

En annen kategori av anti-diabetiske midler som er inhibitorer av karnitin palmitoyl-transferase I (CPT-I), så som etomoxir, som i en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen kan bli brukt med de modifiserte FGF-21 polypeptidene for å modulere blodglukose. Etomoxir inhiberer irreversibelt karnitin palmitoyl-transferase I, som er nødvendig for fettsyreoksidasjon. Slik inhibering kan redusere fastende hyperglykemi, fordi produkter av fettsyreoksidasjon stimulerer hepatisk glukoneogenese. Etomoxir kan forbedre insulinsensitivitet i Type 2 diabetikere. Hubinger et al., *Hormon Metab. Res.* 24:115-18 (1992).

Andre kjente anti-diabetiske midler inkluderer insulinpreparater (f.eks. dyreinsulinpreparater ekstrahert fra bukspyttkjertel av kveg og svin; humane insulinpreparater genetisk syntetisert ved anvendelse av *Escherichia coli*, gjær; sinkinsulin; protamin sinkinsulin; fragment eller derivat av insulin (f.eks. INS-1), oralt insulinpreparat), insulinsensitiserere (f.eks. pioglitazon eller et salt derav (fortrinnsvis hydroklorid), rosiglitazon eller et salt derav (fortrinnsvis maleat), netoglitazon, rivoglitazon (CS-011), FK-614, forbindelsen beskrevet i WO01/38325, tesaglitazar (AZ-242), ragaglitazar (N,N-622), muraglitazar (BMS-298585), edaglitazon (BM-13-1258), metaglidasen (MBX-102); naveglitazar (LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921),  $\alpha$ -glukosidaseinhibitorer (f.eks. voglibose, akarbose, miglitol, emiglital etc.), biguanider (f.eks. fenformin, metformin, buformin eller et salt derav (f.eks. hydroklorid, fumarat, succinat)), insulinsekretagoger [sulfonylurea (f.eks. tolbutamid, glibenclamid, gliklazid, klorpropamid, tolazamid, acetoheksamid, glycopyramid, glimepirid, glipizid, glybuzol), repaglinid, nateglinid, mitiglinid eller kalsiumsalthydrat derav], dipeptidylpeptidase IV

inhibitorer (f.eks. vidagliptin (LAF237), P32/98, sitagliptin (MK-431), P93/01, PT-100, saxagliptin (BMS-477118), T-6666, TS-021), .beta 3 agonister (f.eks. AJ-9677), GPR40 agonister, glukagon-lignende polypeptider (I) (glp 1), (glp2), eller andre diabetogene peptidhormoner, GLP-1 reseptoragonister [f.eks. GLP-1, GLP-1MR middel, N,N-2211, AC-2993 (exendin-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1 (7,37)NH.sub.2, CJC-[131], amylinagonister (f.eks. pramlintid), fosfotyrosin fosfataseinhibitorer (f.eks. natriumvanadat), glukoneogeneseinhibitorer (f.eks. glykogen fosforylaseinhibitorer, glukose-6-fosfataseinhibitorer, glukagonantagonister), SGLUT (natrium-glukose kotransporter) inhibitorer (f.eks. T-1095), 11.beta.-hydroksysteroid dehydrogenaseinhibitorer (f.eks. BVT-3498), adiponektin eller agonister derav, IKK inhibitorer (f.eks. AS-2868), leptinresistens forbedrende legemidler, somatostatin reseptoragonister (forbindelser beskrevet i WO01/25228, WO03/42204, WO98/44921, WO98/45285, WO99/2273.5 etc.), glukokinase aktivatorer (f.eks. R.sup.o-28-1675), GIP (glukose-avhengig insulinotropisk peptid) og lignende kan bli nevnt.

FGF-21 polypeptidet omfattende en ikke-naturlig aminosyre, alene eller i kombinasjon med andre egnede komponenter, kan også bli omarbeidet til aerosolformuleringer (dvs. de kan bli "forstøvet") for å bli administrert via inhalering. Aerosolformuleringer kan bli plassert i trykksatte akseptable drivmidler, så som diklordifluormetan, propan, nitrogen og lignende.

Formuleringer egnet for parenteral administrasjon, slik som, for eksempel, ved intraartikulære (i leddene), intravenøse, intramuskulære, intradermale, intraperitoneale og subkutane ruter, inkluderer vandige og ikke-vandige, isotoniske sterile injeksjonsløsninger, som kan inneholde antioksidanter, buffere, bakteriostater og oppløste stoffer som gjør formuleringen isotonisk med blodet til den tiltenkte resipienten, og vandige og ikke-vandige sterile suspensjoner som kan inkludere suspensjonsmidler, løsningsformidlere, fortykningsmidler, stabilisatorer og konserveringsmidler. Formuleringene av FGF-21 kan bli presentert i enhets-dose eller multi-dose forseglede beholdere, så som ampuller og vialer.

Parenteral administrasjon og intravenøs administrasjon er foretrukne fremgangsmåter for administrasjon. Spesielt administrasjonsrutene som allerede er i bruk for naturlige aminosyrehomolog terapeutika (inkludert men ikke begrenset til, de typisk brukt for EPO, GH, G-CSF, GM-CSF, IFNer, interleukiner, antistoffer, FGFER, og/eller et hvilket som helst annet farmasøytisk levert protein), sammen med formuleringer i gjeldende bruk, tilveiebringer foretrukne ruter for administrasjon og formulering for polypeptidene ifølge oppfinnelsen.

Dosen administrert til en pasient, i konteksten ifølge foreliggende oppfinnelse, er tilstrekkelig til å ha en fordelaktig terapeutisk respons i pasienten over tid, eller annen passende aktivitet, avhengig av anvendelsen. Dosen blir bestemt ved virksomheten av den spesielle vektoren, eller formuleringen, og aktiviteten, stabiliteten eller serum-halverings-

tiden av det anvendte unaturlig aminosyre polypeptidet og tilstanden til pasienten, så vel som kroppsvekten eller overflatearealet av pasienten som skal bli behandlet. Størrelsen av dosen blir også bestemt ved eksistensen, naturen og utstrekningen av hvilke som helst ugunstige bivirkninger som ledsager administrasjonen av en spesiell vektor, formulering eller lignende i en spesiell pasient.

Ved bestemmelse av den effektive mengden av vektoren eller formuleringen som skal bli administrert i behandlingen eller profylaksen av sykdom (inkludert men ikke begrenset til, kreft, arvede sykdommer, diabetes, AIDS eller lignende), evaluerer legen sirkulerende plasmanivåer, formuleringstoksisiteter, progresjon av sykdommen, og/eller hvor relevant, produksjonen av anti-unaturlig aminosyre polypeptid antistoffer.

Dosen administrert, for eksempel, til en 70 kilogram pasient, er typisk i området ekvivalent for doseringer av gjeldende-brukte terapeutiske proteiner, regulert for den endrede aktiviteten eller serum-halveringstiden for den relevante sammensetningen. Vektorene eller de farmasøytiske formuleringene ifølge denne oppfinnelsen kan supplere behandlingsbetingelser ved en hvilken som helst kjent konvensjonell terapi, inkludert antistoffadministrasjon, vaksineadministrasjon, administrasjon av cytotoksiske midler, naturlige aminosyrepolypeptider, nukleinsyrer, nukleotidanaloger, biologisk respons modifikatorer og lignende.

For administrasjon blir formuleringer ifølge foreliggende oppfinnelse administrert ved en rate bestemt ved LD-50 eller ED-50 for den relevante formuleringen, og/eller observasjon av hvilke som helst bivirkninger av de unaturlig aminosyre polypeptidene ved ulike konsentrasjoner, inkludert men ikke begrenset til, som anvendt til massen og generell helse for pasienten. Administrasjon kan bli gjennomført via enkle eller delte doser.

Hvis en pasient som undergår infusjon av en formulering utvikler feber, kuldegysninger eller muskelsmerter, mottar han/hun den passende dosen aspirin, ibuprofen, acetaminofen eller annet smerte/feber kontrollerende legemiddel. Pasienter som opplever reaksjoner til infusjonen så som feber, muskelsmerter og kuldegysninger blir forhåndsmedisinert 30 minutter før fremtidige infusjoner med enten aspirin, acetaminofen, eller inkludert men ikke begrenset til, difenhydramin. Meperidin blir brukt for mer alvorlige kuldegysninger og muskelsmerter som ikke raskt responderer til antipyretika og antihistaminer. Celleinfusjon blir bremset eller avbrutt avhengig av alvorlighetsgraden for reaksjonen.

Humane FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen kan bli administrert direkte til et mammalsk subjekt. Administrasjon er ved en hvilken som helst av rutene som normalt blir brukt for å introdusere FGF-21 polypeptid til et subjekt. FGF-21 polypeptidsammensetningene ifølge utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse inkluderer de egnet for oral, rektal, topisk, inhalering (inkludert men ikke begrenset til, via en aerosol), bukkal (inkludert men ikke begrenset til, sub-lingval), vaginal, parenteral (inkludert men ikke

begrenset til, subkutan, intramuskulær, intradermal, intraartikulær, intrapleural, intraperitoneal, intracerebral, intraarteriell eller intravenøs), topisk (dvs. både hud og mukosale overflater, inkludert luftveisoverflater) og transdermal administrasjon, selv om den mest egnede ruten i et hvilket som helst tilfelle vil avhenge av naturen og alvorlighetsgraden av tilstanden som blir behandlet. Administrasjon kan være enten lokal eller systemisk. Formuleringene av forbindelser kan bli presentert i enhets-dose eller multi-dose forseglede beholdere, så som ampuller og vialer. FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen kan bli fremstilt i en blanding i en enhetsdosering injiserbar form (inkludert men ikke begrenset til, løsning, suspensjon eller emulsjon) med en farmasøytisk akseptabel bærer. FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen kan også bli administrert ved kontinuerlig infusjon (ved anvendelse av, inkludert men ikke begrenset til, minipumper så som osmotiske pumper), enkelt bolus eller sakte-frigivelses depotformuleringer.

Formuleringer egnet for administrasjon inkluderer vandige og ikke-vandige løsninger, isotoniske sterile løsninger, som kan inneholde antioksidanter, buffere, bakteriestater og oppløste stoffer som gjør formuleringen isotonisk, og vandige og ikke-vandige sterile suspensjoner som kan inkludere suspenderingsmidler, løsningsformidlere, fortykningsmidler, stabilisatorer og konserveringsmidler. Løsninger og suspensjoner kan bli fremstilt fra sterile pulvere, granuler og tabletter av typen beskrevet tidligere.

Fryse-tørking er en vanlig anvendt teknikk for å presentere proteiner som tjener for å fjerne vann fra det interessante proteinpreparatet. Fryse-tørking eller lyofilisering, er en prosess hvor materialet som skal bli tørket først blir frosset og deretter blir isen eller det frosne løsemidlet fjernet ved sublimering i et vakuummiljø. En eksipiens kan være inkludert i pre-lyofiliserte formuleringer for å forsterke stabilitet i løpet av fryse-tørkeprosessen og/eller å forbedre stabilitet av det lyofiliserte produktet etter lagring. Pikal, M. *Biopharm.* 3(9)26-30 (1990) og Arakawa et al. *Pharm. Res.* 8(3):285-291 (1991).

Spraytørkingen av farmasøytika er også kjent for fagpersonene. For eksempel, se Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals," i *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992). I tillegg til små-molekyl-farmasøytika, har et mangfold av biologiske materialer blitt spraytørket og disse inkluderer: enzymer, sera, plasma, mikroorganismer og gjærsopper. Spraytørking er en nyttig teknikk fordi det kan omforme et flytende farmasøytisk preparat til et fint, støvfritt eller agglomerert pulver i en ett-trinnsprosess. Den grunnleggende teknikken omfatter de følgende fire trinnene: a) atomisering av tilførselsløsningen til en spray; b) spray-luft kontakt; c) tørking av sprayen; og d) separasjon av det tørkede produktet fra tørkeluften. U.S. patenter nr. 6,235,710 og 6,001,800 beskriver fremstillingen av rekombinant erythropoietin ved spraytørking.

De farmasøytiske sammensetningene og formuleringene ifølge oppfinnelsen kan omfatte en farmasøytisk akseptabel bærer, eksipiens eller stabilisator. Farmasøytisk

akseptable bærere blir bestemt delvis ved den spesielle sammensetningen som blir administrert, så vel som ved den spesielle fremgangsmåten brukt for å administrere sammensetningen. Følgelig, er det en lang rekke egnede formuleringer av farmasøytiske sammensetninger (inkludert valgfrie farmasøytisk akseptable bærere, eksipienser eller stabilisatorer) ifølge foreliggende oppfinnelse (*se, f.eks.* Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. utg. 1985)).

Egnede bærere inkluderer men er ikke begrenset til, buffere inneholdende succinat, fosfat, borat, HEPES, citrat, histidin, imidazol, acetat, bikarbonat og andre organiske syrer; antioksidanter inkludert men ikke begrenset til, askorbinsyre; lav molekylvekt polypeptider inkludert men ikke begrenset til de mindre enn omkring 10 rester; proteiner, inkludert men ikke begrenset til, serumalbumin, gelatin, eller immunoglobuliner; hydrofile polymerer inkludert men ikke begrenset til, polyvinylpyrrolidon; aminosyrer inkludert men ikke begrenset til, glysin, glutamin, asparagin, arginin, histidin eller histidinderivater, metionin, glutamat, eller lysin; monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater, inkludert men ikke begrenset til, trehalose, sukrose, glukose, mannose eller dekstriner; chelatdannere inkludert men ikke begrenset til, EDTA og edentat dinatrium; divalente metallioner inkludert men ikke begrenset til, sink, kobolt eller kobber; sukkeralkoholer inkludert men ikke begrenset til, mannitol eller sorbitol; saltdannende motioner inkludert men ikke begrenset til, natrium og natriumklorid; og/eller non-ioniske surfaktanter inkludert men ikke begrenset til Tween<sup>™</sup> (inkludert men ikke begrenset til, Tween 80 (polysorbat 80) og Tween 20 (polysorbat 20), Pluronic<sup>™</sup> og andre pluronic syrer, inkludert men ikke begrenset til, og andre pluronic syrer, inkludert men ikke begrenset til, pluronic syre F68 (poloksamer 188), eller PEG. Egnede surfaktanter inkluderer for eksempel men er ikke begrenset til polyetere basert på poly(etylenoksid)-poly(propylenoksid)-poly(etylenoksid), dvs. (PEO-PPO-PEO), eller poly(propylenoksid)-poly(etylenoksid)-poly(propylenoksid), dvs. (PPO-PEO-PPO), eller en kombinasjon derav. PEO-PPO-PEO og PPO-PEO-PPO er kommersielt tilgjengelig under varemerkene Pluronic<sup>™</sup>, R-Pluronic<sup>™</sup>, Tetronics<sup>™</sup> og R-Tetronics<sup>™</sup> (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.) og er videre beskrevet i U.S. pat. nr. 4,820,352. Andre etylen/polypropylen blokkpolymerer kan være egnede surfaktanter. En surfaktant eller en kombinasjon av surfaktanter kan bli brukt for å stabilisere PEGylert FGF-21 overfor én eller flere spenninger inkludert men ikke begrenset til spenning som resulterer fra bevegelse. Noen av de over kan bli referert til som "bulkmidler." Noen kan også bli referert til som "tonisitettsmodifikatorer." Antimikrobielle konserveringsmidler kan også bli anvendt for produktstabilitet og antimikrobiell effektivitet; egnede konserveringsmidler inkluderer men er ikke begrenset til, benzylalkohol, benzalkoniumklorid, metakresol, metyl/propylparaben, kresol og fenol, eller en kombinasjon derav.

FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen knyttet til vannløselige polymerer så som PEG kan også bli administrert ved eller som del av forlenget-frigivelse systemer.

Forlenget-frigivelse sammensetninger inkluderer, inkludert men ikke begrenset til, semi-permeable polymermatrikser i form av formede artikler, inkludert men ikke begrenset til, filmer eller mikrokapsler. Forlenget-frigivelse matrikser inkluderer fra biokompatible materialer så som poly(2-hydroksyetyl metakrylat) (Langer et al., *J. Biomed Mater. Res.*, 15: 267-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982), etylenvinylacetat (Langer *et al., supra*) eller poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre (EP 133,988), polylaktider (polymelkesyre) (U.S. patent nr. 3,773,919; EP 58,481), polyglykolid (polymer av glykolsyre), polylaktid ko-glykolid (kopolymerer av melkesyre og glykolsyre) polyanhydrider, kopolymerer av L-glutaminsyre og gamma-etyl-L-glutamat (Sidman et al., *Biopolymers*, 22, 547-556 (1983), poly(orto)estere, polypeptider, hyaluronsyre, kollagen, kondroitinsulfat, karboksylsyrer, fettsyrer, fosfolipider, polysakkarider, nukleinsyrer, polyamino-syrer, aminosyrer så som fenylalanin, tyrosin, isoleucin, polynukleotider, polyvinylpropylen, polyvinylpyrrolidon og silikon. Forlenget-frigivelse sammensetninger inkluderer også en liposomalt fanget forbindelse. Liposomer inneholdende forbindelsen blir fremstilt ved fremgangsmåter kjent per se: DE 3,218,121; Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; U.S. patent nr. 4,619,794; EP 143,949; U.S. patent nr. 5,021,234; japansk pat. søkn. 83-118008; U.S. pat. nr. 4,485,045 og 4,544,545; og EP 102,324.

Liposomalt fangede FGF-21 polypeptider kan bli fremstilt ved fremgangsmåter beskrevet i, f.eks. DE 3,218,121; Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; U.S. patent nr. 4,619,794; EP 143,949; U.S. patent nr. 5,021,234; japansk pat. søkn. 83-118008; U.S. patenter nr. 4,485,045 og 4,544,545; og EP 102,324. Sammensetning og størrelse av liposomer er velkjent eller i stand til å lett bli bestemt empirisk ved en fagperson innen faget. Noen eksempler på liposomer som beskrevet i, f.eks. Park JW, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1327-1331 (1995); Lasic D og Papahadjopoulos D (red): *MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES* (1998); Drummond DC, et al., *Liposomal drug delivery systems for cancer therapy*, i Teicher B (ed): *CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT* (2002); Park JW, et al., *Clin. Cancer Res.* 8:1172-1181 (2002); Nielsen UB, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1591(1-3):109-118 (2002); Mamot C, et al., *Cancer Res.* 63: 3154-3161 (2003).

Dosen administrert til en pasient i konteksten ifølge foreliggende oppfinnelse skulle være tilstrekkelig til å forårsake en fordelaktig respons i subjektet over tid. Generelt blir den totale farmasøytisk effektive mengden av FGF-21 polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert parenteralt per dose i området fra omkring 0,01 µg/kg/dag til omkring 100 µg/kg, eller omkring 0,05 mg/kg til omkring 1 mg/kg, av pasientkroppsvekt, selv om denne er underkastet terapeutisk skjønn. Frekvensen for dosering er også underkastet terapeutisk skjønn, og kan være hyppigere eller mindre hyppig enn de

kommersielt tilgjengelige FGF-21 polypeptidprodukter godkjent for bruk i mennesker. Generelt kan et PEGylert FGF-21 polypeptid ifølge oppfinnelsen bli administrert ved en hvilken som helst av rutene for administrasjon beskrevet over.

I noen utførelsesformer, modulerer modifiserte FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse virkningen av et anti-diabetisk middel. I en annen utførelsesform av foreliggende redegjørelse, kan modifiserte FGF-21 polypeptider bli med-administrert med et anti-diabetisk middel. I en annen utførelsesform av foreliggende redegjørelse kan modifiserte FGF-21 polypeptider bli administrert før behandling med et anti-diabetisk middel. I en annen utførelsesform av foreliggende redegjørelse, kan modifiserte FGF-21 polypeptider bli administrert etter behandling med et anti-diabetisk middel. I en annen utførelsesform av foreliggende redegjørelse, blir modifiserte FGF-21 polypeptider med-administrert med metformin. I en annen utførelsesform av foreliggende redegjørelse, øker terapeutisk behandling med modifiserte FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen og metformin evnen metformin har til å modulere plasmaglukose, i nærvær eller fravær av insulin. I kombinasjonsterapi, har metformin blitt brukt med sulfonylureaer, alfa-glukosidaseinhibitorer, troglitazon og insulin. Metformin kombinert med en sulfonylurea øker insulinsensitivitet og kan senke plasmaglukose. Alternativt, kan metformin med repaglinid være mer effektiv enn glipizid, og minst like effektiv som glyburid, til å opprettholde glykemisk kontroll over mange måneder. Metformin med troglitazon forbedrer glukosekontroll mer enn det ene eller andre midlet alene. Inzucchi et al., *New Eng. J. Med.* 338:867-72 (1998). I noen utførelsesformer av redegjørelsen, blir FGF-21 polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse med-administrert med Klotho beta. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, blir FGF-21 polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse med-administrert med Klotho beta som inkluderer én eller flere ikke-naturlig kodete aminosyrer. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, blir FGF-21 polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse med-administrert med Klotho beta og et anti-diabetisk middel. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, blir FGF-21 polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse med-administrert med et anti-diabetisk middel. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, blir FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse brukt i kombinasjon med én eller flere av de følgende: taurin, alfa liponsyre, en ekstrakt av morbær, krom, glutamin, *Enicostemma littorale* Blume, *Scoparia dulcis*, en ekstrakt av estragon og *Andrographis paniculata*. I noen utførelsesformer av redegjørelsen, blir FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse brukt i kombinasjon med ett eller flere av de følgende: insulinpreparater (f.eks. dyreinsulinpreparater ekstrahert fra bukspyttkjertel av kveg og svin; humane insulinpreparater genetisk syntetisert ved anvendelse av *Escherichia coli*, gjær; sinkinsulin; protamin sinkinsulin; fragment eller derivat av insulin (f.eks. INS-1), oralt insulinpreparat), insulinsensitiserere (f.eks. pioglitazon eller et salt derav (fortrinnsvis hydroklorid), rosiglitazon eller et salt derav (fortrinnsvis maleat), netoglitazon, rivoglitazon (CS-011), FK-614, forbindelsen

beskrevet i WO01/38325, tesaglitazar (AZ-242), ragaglitazar (N,N-622), muraglitazar (BMS-298585), Edaglitazon (BM-13-1258), metaglidasen (MBX-102), naveglitazar (LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921),  $\alpha$ -glukosidaseinhibitorer (f.eks. voglibose, akarbose, miglitol, emigliat etc.), biguanider (f.eks. fenformin, metformin, buformin eller et salt derav (f.eks. hydroklorid, fumarat, succinat)), insulinsekretagoger [sulfonylurea (f.eks. tolbutamid, glibenclamid, gliklazid, klorpropamid, tolazamid, acetoheksamid, glycopyramid, glimepirid, glipizid, glybuzol), repaglinid, nateglinid, mitiglinid eller kalsiumsalhydrat derav], dipeptidyl peptidase IV inhibitorer (f.eks. Vidagliptin (LAF237), P32/98, sitagliptin (MK-431), P93/01, PT-100, saxagliptin (BMS-477118), T-6666, TS-021),  $\beta$ .3 agonister (f.eks. AJ-9677), GPR40 agonister, glukagon-lignende polypeptider (I) (glp I), (glp2), eller andre diabetogene peptidhormoner, GLP-1 reseptoragonister [f.eks. GLP-1, GLP-1MR middel, N,N-2211, AC-2993 (exendin-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1 (7,37)NH.sub.2, CJC-[131], amylinagonister (f.eks. pramlintid), fosfotyrosin fosfatase-inhibitorer (f.eks. natriumvanadat), glukoneogeneseinhibitorer (f.eks. glykogenfosforylaseinhibitorer, glukose-6-fosfataseinhibitorer, glukagonantagonister), SGLUT (natrium-glukose kotransporter) inhibitorer (f.eks. T-1095), 11. $\beta$ -hydroksysteroid dehydrogenaseinhibitorer (f.eks. BVT-3498), adiponektin eller agonister derav, IKK inhibitorer (f.eks. AS-2868), leptinresistensforbedrende legemidler, somatostatin reseptoragonister (forbindelser beskrevet i WO01/25228, WO03/42204, WO98/44921, WO98/45285, WO99/2273,5 etc.), glukokinaseaktivatorer (f.eks. R.sup.o-28-1675), GIP (glukose-avhengig insulinotropisk peptid).

I noen utførelsesformer av redegjørelsen, blir polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse brukt i kombinasjon med insulinpotensiatorer slik som, inkludert men ikke begrenset til, taurin, alfa liponsyre, en ekstrakt av morbær, krom, glutamin, Enicostemma littorale Blume, Scoparia dulcis, en ekstrakt av estragon og Andrographis paniculata. I en annen utførelsesform, kan foreliggende redegjørelse omfatte én eller flere av isomaltose, trehalose eller D-mannose for å ytterligere potensierte sekresjonen eller aktiviteten av insulin. I en ytterligere utførelsesform av redegjørelsen, blir insulinpotensiatoren og polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse brukt i tillegg til et annen anti-diabetisk middel.

En måte som den terapeutiske virksomheten av polypeptidene og kombinerte terapier inkludert foreliggende oppfinnelse polypeptider kan bli bestemt på er ved en reduksjon i pasient HbA1c nivåer. I én utførelsesform, senker polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse HbA1c nivåer med minst en 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, eller minst 50 % forandring fra HbA1c nivåer to måneder før en begynner terapi med modifiserte FGF-21 polypeptider, fra tre måneder før en begynner terapi med modifiserte FGF-21 polypeptider, eller ved prosentandel forandringer fra en



grunnlinje. I en annen utførelsesform, modulerer polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til en pasient som også blir behandlet med et anti-diabetisk middel evnen det anti-diabetiske midlet har til å senke blodglukose. I en annen utførelsesform, senker polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til en pasient som også blir behandlet med et anti-diabetisk middel HbA1c nivåer med minst en 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, eller minst 50 % forandring fra HbA1c nivåer to måneder før en begynner terapi med modifiserte FGF-21 polypeptider, fra tre måneder før en begynner terapi med modifiserte FGF-21 polypeptider, eller ved prosentandel forandringer fra en grunnlinje eller fra en pre-behandling grunnlinje.

I en annen utførelsesform, modulerer modifiserte FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse evnen troglitazon har til å redusere insulinkravene. I en annen utførelsesform, ytterligere utførelsesform, reduserer modifiserte FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse når administrert til en pasient som blir behandlet med troglitazon videre nevnte pasients insulinkrav. Troglitazon brukt i kombinasjon med foreliggende oppfinnelse kan bli brukt for å forsinke eller forhindre Type 2 diabetes i visse utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse.

I én utførelsesform av foreliggende redegjørelse blir modifiserte FGF-21 polypeptider med-administrert med en sulfonylurea. I en annen utførelsesform av foreliggende redegjørelse, blir modifiserte FGF-21 polypeptider administrert før behandling med en sulfonylurea. I en annen utførelsesform av foreliggende redegjørelse, blir modifiserte FGF-21 polypeptider administrert etter behandling med en sulfonylurea. I noen utførelsesformer av foreliggende redegjørelse, vil behandling med en terapeutisk dose av modifiserte FGF-21 polypeptider modulere serumglukose. I en annen utførelsesform av redegjørelsen, blir FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse administrert med Klotho beta som modulerer virkningene av polypeptidene på blodglukose. I en annen utførelsesform av redegjørelsen blir FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse administrert med Klotho beta som reduserer blodglukose mer enn bruk av modifiserte FGF-21 polypeptider alene. I en annen utførelsesform av redegjørelsen blir disse forandringene målt ved anvendelse av HbA1c tester. I en annen utførelsesform av redegjørelsen, blir FGF-21 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse og Klotho beta administrert til en pasient som blir behandlet med et anti-diabetisk middel som reduserer blodglukose mer enn bruk av det anti-diabetiske midlet alene.

35

#### *XV. Terapeutiske anvendelser av FGF 21 polypeptider ifølge oppfinnelsen*

FGF-21 polypeptidene ifølge oppfinnelsen er nyttige for behandling av en lang rekke lidelser.

FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen kan bli brukt for å behandle pattedyr som lider av ikke-insulinavhengig diabetes mellitus (NIDDM: Type 2), insulinavhengig diabetes (Type 1), så vel som obesitet, utilstrekkelig glukoseclearance, hyperglykemi, hyperinsulinemi, og en hvilken som helst annen sykdom eller tilstand som kan være 5 mediert ved FGF-21. Glukoseintoleranse kan bli definert som en eksepsjonell sensitivitet overfor glukose. Hyperglykemi er definert som et overskudd av sukker (glukose) i blodet. Hyperinsulinemi er definert som et høyere-enn-normalt nivå av insulin i blodet. Insulinresistens er definert som en tilstand hvor en normal mengde insulin produserer en subnormal biologisk respons. Obesitet, uttrykt ved det humane subjekt, kan bli definert 10 som kroppsvekt over 20 prosent over den ideelle kroppsvekten for en gitt populasjon (R. H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, s. 904-916).

Diabetes mellitus er karakterisert i to brede grupper basert på kliniske manifestasjoner, nemlig, den ikke-insulin-avhengige eller formen som inntreer ved moden alder, også kjent som Type 2; og den insulin-avhengige eller formen som inntreer i barndommen, 15 også kjent som Type 1. Klinisk, vil hoveddelen av Type 2, moden alder inntredende diabetikere være overvektige, hvor manifestasjoner av kliniske symptomer på sykdommen vanligvis opptrer ved en alder over 40. I motsetning er, Type I, barndoms-inntredende pasienter ikke overvektige i forhold til deres alder og høyde, med hurtig inntreden av sykdommen ved en tidlig alder, ofte før 30, selv om Type 1 diabetes kan 20 forekomme ved en hvilken som helst alder.

Diabetes mellitus er en metabolsk forstyrrelse i mennesker med en prevalens på omtrent én prosent i den generelle populasjon, hvor en fjerdedel av disse er type 1 (Foster, D. W., Harrison's Principles of Internal Medicine, Chap. 114, s. 661-678, 10. utg., McGraw-Hill, New York). Sykdommen tilkjenner seg som en rekke hormon-induserte 25 metabolske abnormaliteter som til slutt fører til alvorlige, langvarige og svekkende komplikasjoner som involverer mange organsystemer inkludert øynene, nyrene, nervene og blodkarene. Patologisk er sykdommen karakterisert ved lesjoner av basalmembranene, som kan påvises under elektronmikroskopi.

Ikke-insulin-avhengig diabetes mellitus (NIDDM: Type 2) er en svekkende 30 sykdom kjennetegnet ved høye sirkulerende blodglukose-, insulin- og kortikosteroid-nivåer. Forekomsten av Type 2 diabetes er høy og stigende og holder på å bli en ledende årsak til mortalitet, morbiditet og forbruk av helsevesen over hele verden (Amos et al., Diabetic Med. 14:S1-85, 1997).

Årsakene til Type 2 diabetes er ikke godt forstått. Type 2 diabetes er kjennetegnet 35 ved overskudd glukoseproduksjon på tross av tilgjengeligheten av insulin, og sirkulerende glukosenivåer forblir overdrevent høye som et resultat av utilstrekkelig glukoseclearance. Det tenkes at både resistens for målvev til virkningen av insulin og redusert insulinsekresjon ("β-celle svikt") forekommer. De viktigste insulin-responderende vevene for glukosehomeostase er lever, hvor insulin stimulerer glykogensyntese og inhiberer

glukoneogenese; muskel, hvor insulin stimulerer glukoseopptak og glykogen stimulerer glukoseopptak og inhiberer lipolyse. Derfor, som en konsekvens av den diabetiske tilstanden, er det forhøyede nivåer av glukose i blodet, og forlenget høyt blodsukker som er indikerende for en tilstand som vil forårsake blodkar og nerveskade.

5 For tiden er der ulike farmakologiske tilnærmelser for behandlingen av Type 2 diabetes (Scheen et al., *Diabetes Care*, 22(9):1568-1577, 1999). De virker via forskjellige virkningsmoduser: 1) sulfonylureaer stimulerer i hovedsak insulinsekresjon; 2) biguanider (metformin) virker ved å fremme glukoseutnyttelse, redusere hepatisk glukoseproduksjon og forminske intestinal glukoseproduksjon; 3)  $\alpha$ -glukosidase-  
10 inhibitorer (akarbose, miglitol) bremser ned karbohydratdigerering og følgelig absorpsjon fra tarmen og reduserer postprandial hyperglykemi; 4) tiazolidindioner (troglitazon) forsterker insulinvirkning, og fremmer derved glukoseutnyttelse i perifere vev; og 5) insulin stimulerer vevsglukoseutnyttelse og inhiberer hepatisk glukoseproduksjon. De farmakologiske tilnærmelsene nevnt over kan bli utnyttet individuelt eller i kombinasjons-  
15 terapi. Hver tilnærming har imidlertid sine begrensninger og ugunstige virkninger.

Obesitet er en kronisk sykdom som i høy grad er prevalent i moderne samfunn og er assosiert ikke bare med et sosialt stigma, men også med redusert levetid og tallrike medisinske problemer inkludert ugunstige psykologisk utvikling, dermatologiske lidelser så som infeksjoner, åreknuter, treningsintoleranse, diabetes mellitus, insulinresistens,  
20 hypertensjon, hyperkolesterolemi og koronær hjertesykdom. Rissanen et al., *British Medical Journal*, 301: 835-837 (1990).

Eksisterende terapier for obesitet inkluderer standarddietter og trening, svært lavkaloridietter, atferdsterapi, farmakoterapi som involverer appetittdepresorer, termogene legemidler, matabsorpsjonsinhibitorer, mekaniske anordninger så som kjevelås,  
25 livremmer og ballonger, og kirurgi. Jung og Chong, *Clinical Endocrinology*, 35: 11-20 (1991); Bray, *Am. J. Clin. Nutr.*, 55: 538S-544S (1992).

Når en tar hensyn til den høye prevalensen av obesitet i samfunnet vårt og de alvorlige konsekvensene assosiert med det, som diskutert over, kunne et hvilket som helst terapeutisk legemiddel potensielt nyttig for å redusere vekt av overvektige personer ha en  
30 dyptgående fordelaktig effekt på deres helse. Det er et behov innen faget for et legemiddel som vil redusere total kroppsvekt for overvektige subjekter mot deres ideelle kroppsvekt uten signifikante ugunstige bivirkninger og som vil hjelpe det overvektige subjektet til å opprettholde det reduserte vektnivået.

Det er derfor ønskelig å tilveiebringe et behandlingsregime som er nyttig for å  
35 returnere kroppsvekten av overvektige subjekter mot en normal, ideell kroppsvekt. Det er videre ønskelig å tilveiebringe en terapi for obesitet som resulterer i vedlikehold av den senkede kroppsvekten i en forlenget tidsperiode.

Obesitet er i høy grad korrelert med insulinresistens og diabetes i forsøksdyr og mennesker. Faktisk er obesitet og insulinresistens, sistnevnte av disse er generelt ledsaget

av hyperinsulinemi eller hyperglykemi, eller begge deler, kjennetegn på Type 2 diabetes. I tillegg, er Type 2 diabetes assosiert med en to- til fire-ganger risiko for koronær arteriesykdom. På tross av tiår med forskning på disse alvorlige helseproblemene, er etiologien for obesitet og insulinresistens ukjent.

5 Type 1 diabetikere viser karakteristisk svært lavt eller umålbart plasmainsulin med forhøyet glukagon. Uavhengig av hva den eksakte etiologien er, har de fleste Type 1 pasienter sirkulerende antistoffer rettet mot deres egne pankreatiske celler inkludert antistoffer overfor insulin, overfor Langerhans-øyer celleytoplasma og overfor enzymet glutaminsyre dekarboksylase. En immunrespons spesifikt rettet mot betaceller  
10 (insulinproduserende celler) fører til Type 1 diabetes. Denne spesifisiteten er støttet ved det kliniske bildet over, siden betaceller utsondrer insulin mens alfaceller utsondrer glukagon.

Nåværende terapeutiske regimer for Type 1 diabetes inkluderer modifikasjoner til dietten for å minimere hyperglykemi som resulterer fra mangelen på naturlig insulin, som  
15 i sin tur, er resultatet av skadede betaceller. Diett blir også modifisert med hensyn til insulinadministrasjon for å motvirke de hypoglykemiske virkningene av hormonet. Uansett form for behandling, parenteral administrasjon av insulin er krevet for alle Type 1 diabetikere, følgelig begrepet "insulin-avhengig" diabetes.

Det er derfor et behov for en effektiv terapi av Type 2 diabetes som har færre  
20 ugunstige virkninger enn de tilgjengelige farmasøytiske tilnærmelsene. Dessuten kunne en effektiv alternativ terapi til insulin være nyttig for behandlingen av Type 1 diabetes. Foreliggende redegjørelse tilveiebringer en farmakologisk terapi som stimulerer glukoseopptak og forsterker insulinsensitivitet i perifere vev og har færre ugunstige virkninger enn gjeldende behandlingsregimer for Type 2 diabetes. I tillegg tilveiebringer  
25 foreliggende redegjørelse en alternativ behandling for Type 1 diabetes. Dessuten er foreliggende oppfinnelse nyttig for behandling av obesitet ved å øke energiforbruk ved raskere og mer effektiv glukoseutnyttelse.

Foreliggende redegjørelse tilveiebringer en fremgangsmåte for behandling av et pattedyr som utviser én eller flere av Type 1 diabetes, Type 2 diabetes, obesitet,  
30 insulinresistens, hyperinsulinemi, glukoseintoleranse eller hyperglykemi, omfattende å administrere til nevnte pattedyr med behov for slik behandling en terapeutisk effektiv mengde av FGF-21 polypeptidet ifølge oppfinnelsen.

Fremgangsmåten for behandling kan være tilstrekkelig til å oppnå i nevnte pattedyr  
35 minst én av de følgende modifikasjoner: reduksjon i kroppsfettlager, minskning av insulinresistens, reduksjon av hyperinsulinemi, økning i glukosetoleranse og reduksjon av hyperglykemi.

I et annet aspekt, omhandler foreliggende redegjørelse en fremgangsmåte for å behandle et husdyr inkludert men ikke begrenset til, kveg, griser, sauer, hester og lignende, omfattende administrering av en effektiv mengde av FGF-21 eller variant derav,

for å redusere kroppsfettlagere. Reduksjonen av kroppsfettlagere på lang sikt, eller permanent basis i husdyr ville åpenbart være av betydelig økonomisk fordel for mennesker, spesielt siden dyr leverer en hoveddel av menneskets diett; og dyrefettet kan ende opp som de novo fettavsetninger i mennesker.

5           Fibroblastvekstfaktor 21 (FGF-21) kan bli brukt for å redusere morbiditeten og mortaliteten assosiert med kritisk syke pasienter. Se U.S. patentpublikasjon nr. 20050176631. Kritisk syke pasienter som krever intensive pleie i en forlenget tidsperiode har en høy risiko for død og betydelig mortalitet. En vanlig årsak til at pasienter legges inn ved intensiv-medisin enheter (ICUer) er systemisk inflammatorisk respons syndrom (SIRS) assosiert med infeksjøs skader (sepsis) så vel som ikke-infeksjøs patologiske årsaker så som pankreatitt, iskemi, multiple traumer og vevsskade, hemoragisk sjokk og immun-mediert organskade. Foreliggende redegjørelse omspenner også en fremgangs-  
10 måte for å redusere mortalitet og morbiditet i kritisk syke pasienter som lider av systemisk inflammatorisk respons syndrom (SIRS) assosiert med infeksjøs skader så vel som ikke-  
15 infeksjøs patologiske årsaker som omfatter administrering til de kritisk syke pasientene av en terapeutisk effektiv mengde av FGF-21. Eksempler på betingelser som involverer SIRS inkluderer sepsis, pankreatitt, iskemi, multiple traumer og vevsskade, hemoragisk sjokk, immun-mediert organskade, akutt lungesviktsyndrom (ARDS), sjokk, nyresvikt og  
20 multippelt organdysfunksjonssyndrom (MODS). Foreliggende redegjørelse omspenner også en fremgangsmåte for å redusere mortalitet og morbiditet i kritisk syke pasienter som lider av lungesvikt.

En hyppig komplikasjon av SIRS er utviklingen av organsystemdysfunksjon, inkludert akutt lungesviktsyndrom (ARDS), sjokk, nyresvikt og multippelt organdysfunksjonsyndrom (MODS), alle disse forsterker risikoen for et ugunstig resultat. Selv om  
25 mange spesialister antar at noen type av ernæringsstøtte er fordelaktig for kritisk syke pasienter for å bidra til å gjendanne metabolsk stabilitet, forblir fordelene og særegenhetene ved slik støtte kontroversiell på grunn av mangelen på godt kontrollerte randomiserte kliniske forsøk.

Fordi hyperglykemi og insulinresistens er vanlig i kritisk syke pasienter gitt  
30 ernæringsstøtte, administrerer noen ICUer insulin for å behandle overdreven hyperglykemi i matede kritisk syke pasienter. Nyere studier dokumenterer faktisk at anvendelsen av eksogent insulin for å opprettholde blodglukose ved et nivå ikke høyere enn 110 mg per desiliter, redusere morbiditet og mortalitet blant kritisk syke pasienter i den kirurgiske intensivpleieenheten, uavhengig av om de hadde en historie med diabetes  
35 (Van den Berghe, et al. N Engl J Med., 345(19):1359, 2001).

Foreliggende redegjørelse omspenner en fremgangsmåte for å redusere mortaliteten og morbiditeten i disse kritisk syke pasientene ved administrasjonen av FGF-21. De kritisk syke pasientene omspent ved foreliggende oppfinnelse opplever generelt en ustabil hypermetabolsk tilstand. Denne ustabile metabolske tilstanden skyldes

forandringer i substratmetabolisme som kan føre til relative mangler i noen næringsmidler. Det er generelt øket oksidasjon av både fett og muskel.

De kritisk syke pasientene hvori administrasjonen av FGF-21 kan redusere risikoen for mortalitet og morbiditet er fortrinnsvis pasienter som opplever systemisk inflammatorisk respons syndrom eller lungesvikt. En reduksjon i morbiditet betyr å redusere sannsynligheten for at en kritisk syk pasient vil utvikle ytterligere sykdommer, tilstander eller symptomer eller redusere alvorlighetsgraden av ytterligere sykdommer, tilstander eller symptomer. For eksempel kan det å redusere morbiditet tilsvare en reduksjon i forekomsten av bakteremi eller sepsis eller komplikasjoner assosiert med multipel organsvikt.

Systemisk inflammatorisk respons syndrom (SIRS) beskriver en inflammatorisk prosess assosiert med et stort antall kliniske tilstander og inkluderer, men er ikke begrenset til, mer enn én av de følgende kliniske manifestasjoner: (1) en kroppstemperatur høyere enn 38 °C eller mindre enn 36 °C; (2) en hjerterytme høyere enn 90 slag per minutt; (3) takypné, manifestert ved en åndedrettshastighet høyere enn 20 åndedrag per minutt, eller hyperventilering, som indikert ved et PaCO<sub>2</sub> på mindre enn 32 mm Hg; og (4) en endring i det hvite blodcelleantallet, så som et antall større enn 12.000/cu mm, et antall mindre enn 4.000/cu mm, eller nærværet av mer enn 10 % umodne nevtrofiler. Disse fysiologiske forandringene skulle representere en akutt endring fra grunnlinje i fraværet av andre kjente årsaker for slike abnormaliteter, så som kjemoterapi, industert nevtropeni og levkopeni.

Sepsis er definert som en SIRS som oppstår fra infeksjon. Ikke-infeksiøse patogener årsaker til SIRS kan inkludere pankreatitt, iskemi, multipelt traume og vevsskade, inkludert men ikke begrenset til, knusningsskader eller alvorlige forbrenninger, hemoragisk sjokk, immun-mediert organskade og den eksogene administrasjon av slike antatte mediatorer av den inflammatoriske prosessen som tumornekrosefaktor og andre cytokiner.

Septisk sjokk og multi-organ dysfunksjon er hovedbidragsyttere til morbiditet og mortalitet i ICU settingen. Sepsis er assosiert med og mediert ved aktivering av flere av vertens forsvarsmekanismer inkludert det cytokine nettverk, leukocytter og komplementkaskaden, og koagulering/fibrinolysesystemer inkludert endoteliet. Disseminert intravasal koagulasjon (DIC) og andre grader av konsumkoagulopati assosiert med fibrinavsetning innen mikrovaskulaturen av ulike organer, er manifestasjoner av sepsis/septisk sjokk. Nedstrømsvirkningene av vertens forsvarsrespons på målorganer er en viktig mediator i utviklingen av multipelt organdysfunksjon syndrom (MODS) og bidrar til den dårlige prognosen for pasienter med sepsis, alvorlig sepsis og sepsis komplisert med sjokk.

Lungesvikt betegner en tilstand hvori pasienter har vanskelighet med å puste på grunn av noen type av pulmonal dysfunksjon. Ofte utviser disse pasientene varierende grader av hypoksemi som kan være eller ikke være refraktær til behandling med

tilleggsoksygen. Lungesvikt kan forekomme i pasienter med svekket pulmonal funksjon på grunn av direkte lungeskade eller kan forekomme på grunn av indirekte lungeskade så som i settingen med en systemisk prosess. I tillegg, nærværet av mange predisponerende lidelser øker risikoen betydelig, det samme gjør nærværet av sekundære faktorer så som kronisk alkoholmisbruk, kronisk lungesykdom og en lav serum pH.

Noen årsaker til direkte lungeskade inkluderer pneumoni, innånding av mageinnhold, pulmonal kontusjon, fettemboli, nærdrukning, inhaleringsskade, stor høyde og reperfusjon pulmonalt ødem etter lungetransplantasjon eller pulmonal embolektomi. Noen årsaker til indirekte lungeskade inkluderer sepsis, alvorlig traume med sjokk og mange transfusjoner; kardiopulmonal bypass, legemiddeloverdose, akutt pankreatitt og transfusjoner av blodprodukter.

Én klasse av pulmonale lidelser som forårsaker lungesvikt er assosiert med syndromet kjent som Cor Pulmonale. Disse lidelsene er assosiert med kronisk hypoksemi som resulterer i økede trykk innen den pulmonale sirkulasjon kalt pulmonal hypertensjon. Den følgende pulmonale hypertensjon øker arbeidsbelastningen for den høyre ventrikkelen, og fører derfor til dens forstørrelse eller hypertrofi. Cor Pulmonale viser seg generelt som høyrehjertesvikt definert ved en forlenget økning i høyre ventrikulære trykk og klinisk bevis for redusert venøs retur til det høyre hjertet.

Kronisk obstruktive lungesykdommer (COPDer) som inkluderer emfysem og kronisk bronkitt forårsaker også lungesvikt og er karakterisert ved obstruksjon til luftstrøm. COPDer er den fjerde viktigste dødsårsaken og krever over 100.000 liv årlig.

Akutt lungesviktsyndrom (ARDS) er generelt progressiv og karakterisert ved distinkte stadier. Syndromet tilkjenner seg generelt ved den hurtige inntreden av lungesvikt i en pasient med en risikofaktor for tilstanden. Arteriell hypoksemi som er refraktær til behandling med tilleggsoksygen er et karakteristisk kjennetegn. Det kan være fylling av alveolene, konsolidasjon og atelektase forekommende i avhengige lungesoner; imidlertid, kan ikke-avhengige områder ha betydelig inflammasjon. Syndromet kan utvikle seg videre til fibroserende alveolitt med persistent hypoksemi, øket alveolært dødrom, og en videre reduksjon i pulmonal føyelighet. Pulmonal hypertensjon som resulterer fra skade til det pulmonale kapillærsjiktet kan også utvikles.

Alvorlighetsgraden av klinisk lungeskade varierer. Både pasienter med mindre alvorlig hypoksemi som definert ved et forhold av partialtrykket av arterielt oksygen til fraksjonen av innåndet oksygen som 300 eller mindre og pasienter med mer alvorlig hypoksemi som definert ved et forhold på 200 eller mindre er omfattet ved foreliggende oppfinnelse. Generelt er pasienter med et forhold 300 eller mindre klassifisert som å ha akutt lungeskade og pasienter som har et forhold på 200 eller mindre er klassifisert som å ha akutt lungesviktsyndrom.

Den akutte fasen av akutt lungeskade blir karakterisert ved en innstrømning av protein-rikt ødemfluid til lufttrommene som en konsekvens av øket vaskulær permeabilitet

av den alveolær-kapillære barriere. Tapet av epitelial integritet hvor permeabilitet blir endret kan forårsake oversvømmelse av alveolene, avbryte normal fluidtransport som påvirker fjerningen av ødemfluid fra det alveolære rom, redusere produksjonen og gjennomgangen av surfaktant, føre til septisk sjokk i pasienter med bakteriell pneumoni og forårsake fibrose. Sepsis er assosiert med den høyeste risikoen for progresjon til akutt lungeskade.

I tilstander så som sepsis, hvor hypermetabolisme forekommer, er det en akselerert proteinnedbrytning både for å bevare glukoneogenese og for å frigi aminosyrene krevet for øket proteinsyntese. Hyperglykemi kan foreligge og høye konsentrasjoner av triglyserider og andre lipider i serum kan foreligge.

For pasienter med risikert respiratorisk funksjon, kan hypermetabolisme påvirke forholdet av karbondioksidproduksjon til oksygenforbruk. Dette er kjent som den respiratoriske kvotient ( $R/Q$ ) og er i normale individer mellom omkring 0,85 og omkring 0,90. Overdreven fettmetabolisme har en tendens til å senke  $R/Q$  mens overdreven glukosemetabolisme øker  $R/Q$ . Pasienter med lungesvikt har ofte vansker med å eliminere karbondioksid og har derfor unormalt høye respiratoriske kvotienter.

De kritisk syke pasientene omspent ved foreliggende oppfinnelse opplever også generelt en spesiell stressrespons karakterisert ved en forbigående nedregulering av de fleste cellulære produkter og opp-reguleringen av varmesjokkproteiner. Dessuten, involverer denne stressresponsen aktiveringen av hormoner så som glukagon, veksthormon, kortisol og pro- og anti-inflammatoriske cytokiner. Selv om denne stressresponsen synes å ha en beskyttende funksjon, danner responsen ytterligere metabolsk instabilitet i disse kritisk syke pasientene. For eksempel forårsaker aktivering av disse spesifikke hormonene forhøyelser i serumglukose som resulterer i hyperglykemi. I tillegg kan skade til hjertet og andre organer bli forverret ved adrenerge stimuli. Det kan videre være forandringer til skjoldbruskkjertelen som kan ha signifikante virkninger på metabolsk aktivitet.

Gjennomsnittlige kvantiteter av FGF-21en kan variere og skulle spesielt være basert på anbefalingene og foreskrivelsen til en kvalifisert lege. Den eksakte mengden av FGF-21 er et spørsmål om preferanse utsatt for slike faktorer som den eksakte typen tilstand som blir behandlet, tilstanden til pasienten som blir behandlet, så vel som de andre ingrediensene i sammensetningen. Oppfinnelsen sørger også for administrasjon av en terapeutisk effektiv mengde av et annet aktivt middel. Mengden som skal bli gitt kan lett bli bestemt ved en fagperson basert på terapi med FGF-21.

Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan bli tilvirket på en konvensjonell måte.



## EKSEMPLER

De følgende eksemplene tilbys for å illustrere, men begrenser ikke den krevde oppfinnelsen.

### Eksempel 1

5 Dette eksempelet beskriver ett av de mange potensielle settene av kriterier for seleksjonen av seter for inkorporering av ikke-naturlig kodede aminosyrer til FGF-21.

Figur 1 viser sekvenshomologien mellom FGF-21 (Proteinaksesjonsnummer BC018404) og FGF-19 (Proteinaksesjonsnummer BAA75500) som bestemt ved anvendelse av vektor NTI (Invitrogen; Carlsbad, CA). Aminosyrene merket med en 10 stjerne er lignende mellom de to molekylerne. Aminosyrene som er understreket er identiske mellom de to polypeptidene. Syv forskjellige FGF-21 polypeptider ble generert ved å substituere en naturlig kodet aminosyre med en ikke-naturlig kodet aminosyre. Hvert polypeptid hadde én av aminosyrene merket med et rektangel i Figur 1 substituert med para-acetylfenylalanin. De genererte polypeptidene manglet ledersekvensen vist i 15 figurene 1 og 3 og var His-tagget ved N-terminusen med 6 histidinrester. SEKV ID NR.: 1 er en 181 aminosyresekvens av human FGF-21 (P-form) uten ledersekvensen. SEKV ID NR.: 2 er sekvensen av human FGF-21 (P-form) uten ledersekvensen og med en His-tag ved N-terminusen. Hvert av de genererte polypeptidene hadde en ikke-naturlig kodet aminosyresubstitusjon ved én av de følgende posisjonene 10, 52, 77, 117, 126, 131 og 162 20 ifølge SEKV ID NR: 1.

Figur 2 viser strukturen av human FGF-19 som ble oppnådd fra proteindatabanken (PDB) (Bernstein et al. J. Mol. Biol. 1997, 112, s 535) (IPWA) og ble merket ved anvendelse av PyMOL programvaren (DeLano Scientific; Palo Alto, CA). Aminosyrene tilsvarende V34, L79, G104, S144, K155, L160 og S196 av FGF-19 ble substituert med 25 para-acetylfenylalanin i FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen. Den stiplede linjen indikerer regioner som ikke ble oppløst i den opprinnelige strukturen.

Figur 3 viser sekvenshomologien mellom FGF-21 (Proteinaksesjonsnummer BC018404) og FGF-2 (Proteinaksesjonsnummer BAA75500) som bestemt ved anvendelse av vektor NTI (Invitrogen; Carlsbad, CA). Aminosyrene merket med en 30 stjerne er lignende mellom de to molekylerne. Aminosyrene som er understreket er identiske mellom de to polypeptidene. De 7 aminosyrene vist i Figur 1 som seter for substitusjon er også plassert i et rektangel i Figur 3.

Figur 4 viser strukturen av human FGF-2 struktur som ble oppnådd fra PDB (ICVS) og ble merket ved anvendelse av PyMOL programvaren (DeLano Scientific; Palo 35 Alto, CA). De grå strukturene er human FGF-reseptor 1 (FGFR1) og de svarte er human FGF2. Plotnikov, AN et al. Cell. 1999 Sep 3;98(5):641-50 beskriver krystallstrukturen av FGF2 bundet til FGF-reseptor. Aminosyrene tilsvarende F21, K62, K86, V125, K134, T139 av FGF-2 ble substituert med para-acetylfenylalanin i FGF-21 polypeptider ifølge

oppfinnelsen. Den stiplede linjen indikerer regioner som ikke ble oppløst i den opprinnelige strukturen.

Et annet sett av kriterier for seleksjonen av foretrukne seter for inkorporering av ikke-naturlig kodede aminosyrer er det følgende. Ti krystallstrukturer fra proteindatabanken ble brukt for å modellere strukturen av FGF-21: 1PWA (human FGF-19); 1IJT (human FGF-4); INUN (human FGF10-FGF-reseptor 2b kompleks); 1G82 (human FGF-9 dimer med FGF-reseptor og heparin); 1IHK (human FGF-9); IBAR (bovin FGF-1); 1QQK (rotte FGF-7); 1K5U (human FGF-1); 1FQ9 (human FGF-2 med FGF-reseptor 1 og heparin); og 2FDB (human FGF-8b med FGF-reseptor 2c). Koordinatene for disse strukturene er tilgjengelige fra proteindatabanken (PDB) (Bernstein et al. J. Mol. Biol. 1997, 112, s. 535). En sammenligning av krystallstrukturene indikerte at de alle var svært lignende i kjernestrukturen. Imidlertid ble N- og C-terminiene funnet å være svært divergente mellom disse FGF-molekylene, og derfor kunne ikke terminiene bli modellert. Modelleringen identifiserte to rester, Y22 og Y104, som i høy grad ble bevart og var involvert med reseptorbinding. To potensielle heparinbindingsseter ble også identifisert som involverer R36 og E37. Aminosyreposisjonene identifisert for reseptorbindings- og heparinbindingsrestene tilsvarer SEKV ID NR: 1.

Som et resultat, ble det identifisert rester som 1) ikke ville forstyrre binding til FGF-reseptoren eller heparin, 2) ikke ville foreligge i det indre av proteinet, og 3) ville være i regioner som var rimelig konsistente mellom krystallstrukturene. Én ikke-naturlig kodet aminosyre er inkorporert ved de følgende posisjonene av FGF-21: 108 SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7).

De følgende kriteriene ble brukt for å evaluere hver posisjon av FGF-21 for introduksjonen av en ikke-naturlig kodet aminosyre: resten (a) skulle ikke forstyrre binding av FGF-21 reseptoren basert på strukturell analyse, b) skulle ikke bli påvirket ved alanin eller homolog skanning mutagenese (c) skulle være overflateeksponert og utvise minimale van der Waals eller hydrogenbinding vekselvirkninger med omkringliggende rester, (d) skulle være enten tatt bort eller variabel i FGF-21 varianter, (e) ville resultere i konservative forandringer etter substitusjon med en ikke-naturlig kodet aminosyre og (f) kunne bli funnet i enten svært fleksible regioner eller i strukturelt rigide regioner.

Ytterligere eller forskjellige krystallstrukturer for medlemmer av FGF-familien så som strukturer for FGF-23 og/eller FGF-19 kan også bli brukt for å velge seter for inkorporering av én eller flere ikke-naturlig kodede aminosyrer til FGF-21. For eksempel kan krystallstrukturen av human FGF-19 (PDB ID 2P23) og/eller krystallstruktur av human FGF-19 (PDB ID 2P23) og/eller human FGF-23 (PDB ID 2P39) tilveiebringe ytterligere informasjon for å velge seter for inkorporering av ikke-naturlig kodede aminosyrer til FGF-21. Slike seter kan være i forskjellige regioner av proteinet, inkludert men ikke begrenset til, N- og C- terminiene, reseptorbindende og heparinbindende regioner. I tillegg, kan videre beregninger bli utført på FGF-21 molekylet, ved å anvende

Cx programmet (Pintar et al. (2002) *Bioinformatics*, 18, pp 980) for å evaluere utstrekningen av fremraging for hvert proteinatom.

Én ikke-naturlig kodet aminosyre er inkorporert i de følgende posisjoner i FGF-21: 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7).

5

### Eksempel 2

Dette eksempelet detaljerer kloning og ekspresjon av et FGF-21 polypeptid inkludert en ikke-naturlig kodet aminosyre i *E. coli*. Dette eksempelet beskriver også én fremgangsmåte for å analysere den biologiske aktiviteten av modifiserte FGF-21 polypeptider.

10

Fremgangsmåter for kloning av FGF-21 er kjent for fagpersonene. Polypeptid og polynukleotidsekvenser for FGF-21 og kloning av FGF-21 i vertsceller er detaljert i U.S. patent nr. 6,716,626; U.S. patentpublikasjoner nr. 2005/0176631, 2005/0037457, 2004/0185494, 2004/0259780, 2002/0164713 og 2001/0012628; WO 01/36640; WO 03/011213; WO 03/059270; WO 04/110472; WO 05/061712; WO 05/072769; WO 05/091944; WO 05/113606; WO 06/028595; WO 06/028714; WO 06/050247; WO 06/065582; WO 06/078463.

15

cDNA som koder for P-formen av FGF-21 uten ledersekvensen er vist som SEKV ID NR: 8. Dette polypeptidet er vist som SEKV ID NR: 1.

20

cDNA som koder for en His-tagget P-form av FGF-21 uten en ledersekvens er vist som SEKV ID NR: 9. Dette polypeptidet er vist som SEKV ID NR: 2.

cDNA som koder for P-formen av FGF-21 med en ledersekvens inneholdende 3 leuciner sammen er vist som SEKV ID NR: 10. Dette polypeptidet er vist som SEKV ID NR: 3.

25

cDNA som koder for P-formen av FGF-21 med en ledersekvens inneholdende 2 leuciner sammen er vist som SEKV ID NR: 11. Dette polypeptidet er vist som SEKV ID NR: 4.

cDNA som koder for L-formen av FGF-21 uten ledersekvensen er vist som SEKV ID NR: 12. Dette polypeptidet er vist som SEKV ID NR: 5.

30

cDNA som koder for L-formen av FGF-21 med en ledersekvens inneholdende 3 leuciner sammen er vist som SEKV ID NR: 13. Dette polypeptidet er vist som SEKV ID NR: 6.

cDNA som koder for L-formen av FGF-21 med en ledersekvens inneholdende 2 leuciner sammen er vist som SEKV ID NR: 14. Dette polypeptidet er vist som SEKV ID NR: 7.

35

Et introdusert translasjonssystem som omfatter et ortogonalt tRNA (O-tRNA) og en ortogonal aminoacyl tRNA syntetase (O-RS) blir brukt for å uttrykke FGF-21 inneholdende en ikke-naturlig kodet aminosyre. O-RSen vil fortrinnsvis aminoacylere O-tRNAet med en ikke-naturlig kodet aminosyre. I sin tur setter translasjonssystemet inn

den ikke-naturlig kodede aminosyren i FGF-21, som svar på et kodet selektorkodon. Egnede O-RS og O-tRNA sekvenser er beskrevet i WO 2006/068802 med tittel "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof" (E9; SEKV ID NR: 15) og WO 2007/021297 med tittel "Compositions of tRNA and Uses Thereof" (F13; SEKV ID NR: 16)

5

Tabell 2: O-RS og O-tRNA sekvenser.

SEKV ID NR: 17	<i>M. jannaschii</i> mtRNA <sup>Tyr</sup> <sub>CUA</sub>	tRNA
SEKV ID NR: 18	<i>HLAD03; et optimalisert ambersupressor tRNA</i>	tRNA
SEKV ID NR: 19	<i>HL325A; et optimalisert AGGA rammeskiftsupressor tRNA</i>	tRNA
SEKV ID NR: 20	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-L-fenylalanin p-Az-PheRS(6)</i>	RS
SEKV ID NR: 21	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-benzoyl-L-fenylalanin p-BpaRS(1)</i>	RS
SEKV ID NR: 22	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av propargyl-fenylalanin Propargyl-PheRS</i>	RS
SEKV ID NR: 23	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av propargyl-fenylalanin Propargyl-PheRS</i>	RS
SEKV ID NR: 24	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av propargyl-fenylalanin Propargyl-PheRS</i>	RS
SEKV ID NR: 25	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin p-Az-PheRS(1)</i>	RS
SEKV ID NR: 26	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin p-Az-PheRS(3)</i>	RS
SEKV ID NR: 27	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin p-Az-PheRS(4)</i>	RS
SEKV ID NR: 28	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin p-Az-PheRS(2)</i>	RS
SEKV ID NR: 29	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-acetyl-fenylalanin (LW1)</i>	RS
SEKV ID	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-</i>	RS

NR:30	<i>acetyl-fenylalanin (LW5)</i>	
SEKV ID NR:31	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-acetyl-fenylalanin (LW6)</i>	RS
SEKV ID NR:32	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin (AzPheRS-5)</i>	RS
SEKV ID NR:33	<i>Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin (AzPheRS-6)</i>	RS

Transformasjonen av *E. coli* med plasmider inneholdende det modifiserte FGF-21 genet og det ortogonale aminoacyl tRNA syntetase/tRNA paret (spesifikt for den ønskede ikke-naturlig kodede aminosyren) tillater den sete-spesifikke inkorporeringen av ikke-naturlig kodet aminosyre i FGF-21 polypeptidet.

Vill-type modent FGF-21 ble amplifisert ved PCR fra en cDNA syntesereaksjon avledet fra frisk human lever polyA+ mRNA (Biochain) ved anvendelse av standard protokoller og klonet i pET30 (NcoI-BamHI). Etter sekvensbekreftelse, ble FGF-21 inkludert en N-terminal HHHHHHSGG sekvens subklonet inn i en supresjonsvektor inneholdende en ambersuppressor tyrosyl TRNA<sup>Tyr/CUA</sup> fra *Methanococcus jannaschii* (*Mj* tRNA<sup>Tyr/CUA</sup>) under konstitutiv kontroll av en syntetisk promoter avledet fra *E. coli* lipoprotein promotersekvensen (Miller, J.H., Gen, 1986), så vel som vel som den ortogonale tyrosyl-tRNA-syntetase (*Mj*TyrRS) under kontroll av *E. coli* GlnRS promoteren. Ekspresjon av FGF-21 var under kontroll av T7 promoteren. Ambermutasjoner ble introdusert ved anvendelse av standard "quick change" mutasjonsprotokoller (Stratagene; La Jolla, California). Alle konstrukter ble sekvensverifisert.

#### Supresjon med para-acetyl-fenylalanin (pAcF)

Plasmider (pVK3-HisFGF21) ble transformert til W3110 B2 stammen av *E. coli* hvor ekspresjon av T7 polymerasen var under kontroll av en arabinose-induserbar promoter. Overnatts-bakterielle kulturer ble fortennet 1:100 i ristekolber inneholdende 2X YT kulturmedier og dyrket ved 37 °C til en OD<sub>600</sub> på ~ 0,8. Proteinekspresjon ble induert ved tilsetningen av arabinose (0,2 % slutt), og *para*-acetyl-fenylalanin (pAcF) til en sluttkonsentrasjon på 4 mM. Kulturer ble inkubert ved 37 °C i 4 timer. Celler ble pelletisert og resuspendert i B-PER lysisbuffer (Pierce) 100 ul/OD/ml + 10 ug/ml DNase og inkubert ved 37 °C i 30 min. Cellulært materiale ble fjernet ved sentrifugering og supernatanten fjernet. Pelleten ble re-suspendert i en lik mengde SDS-PAGE proteinbeladningsbuffer. Alle prøver ble forsynt på en 4-12 % PAGE gel med MES og DTT. Fremgangsmåter for rensing av FGF-21 er kjent for fagpersonene og blir bekreftet

ved SDS-PAGE, Western Blott analyser eller elektrospray-ionisering ionefelle massespektrometri og lignende.

Ekspresjon av N-terminal His-tagget FGF-21 og supresjon ved 7 amberseter er vist som Figur 5. FGF-21 polypeptidet er merket med en pil. Figur 5 viser B-PER  
 5 pelletprøvene- Spor 1: Markør; Spor 2: VK3-FGF21 preinduksjon, supernatant; Spor 3: VK3-FGF21 preinduksjon, pellet; Spor 4: VK3-FGF21 0,2 % arabinose, supernatant; Spor 5: VK3-FGF21 0,2 % arabinose, pellet; Spor 6: VK3-FGF21- pAcF- L10, 0,2 % arabinose; Spor 7: VK3-FGF21- pAcF- L52, 0,2 % arabinose; Spor 8: VK3-FGF21- pAcF- R77, 0,2 % arabinose; Spor 9: VK3-FGF21- pAcF- H117, 0,2 % arabinose; Spor  
 10 10: VK3-FGF21- pAcF- R126, 0,2 % arabinose; Spor 11: VK3-FGF21- pAcF- R131, 0,2 % arabinose; Spor 12: VK3-FGF21- pAcF-S 162, 0,2 % arabinose. Posisjonsnumrene indikert for aminosyresubstitusjonen er basert på SEKV ID NR: 1.

Figur 6 viser B-PER supernatantprøvene-Spor 1: VK3-FGF21 preinduksjon, supernatant; Spor 2: VK3-FGF21 preinduksjon, pellet; Spor 3: Markør; Spor 4: VK3-  
 15 FGF21 0,2 % arabinose, supernatant; Spor 5: VK3-FGF21 0,2 % arabinose, pellet; Spor 6: VK3-FGF21- pAcF- L10, 0,2 % arabinose; Spor 7: VK3-FGF21- pAcF- L52, 0,2 % arabinose; Spor 8: VK3-FGF21- pAcF- R77, 0,2 % arabinose; Spor 9: VK3-FGF21- pAcF- H117, 0,2 % arabinose; Spor 10: VK3-FGF21- pAcF- R126, 0,2 % arabinose; Spor  
 20 11: VK3-FGF21- pAcF-R131, 0,2 % arabinose; Spor 12: VK3-FGF21- pAcF- S162, 0,2 % arabinose. Posisjonsnumrene indikert for aminosyresubstitusjonen er basert på SEKV ID NR: 1.

His-taggede mutante FGF-21 proteiner kan bli rensset ved anvendelse av fremgangsmåter kjent for fagpersonene. Den ProBond nikkkel-chelatdannende harpiksen (Invitrogen, Carlsbad, CA) kan bli brukt via de standard His-taggede proteinrens-  
 25 prosedyrene tilveiebrakt ved produsentene.

pVK10 (Figur 24) ble utviklet for bruk med det utaggede FGF-21 proteinet, som har en sekvens gitt i Figur 25. Dette var vektoren brukt for å lage R36am og Y83am mutanter og det er videre data om disse ikke-His taggede FGF-21 mutante proteinene og deres rensing senere i eksemplene og vist gjennom alle figurene.  
 30

#### Differensiering av 3T3-L1 til adipocytter og glukoseopptaksanalyse

For å analysere den biologiske aktiviteten av FGF-21 polypeptider, kan den følgende analysen bli utført. Muse 3T3-L1 fibroblaster (ATCC #CL-173) blir sådd i en 10 cm skål med DMEM inneholdende 10 % bovint kalveserum. Cellene blir holdt ved en  
 35 tetthet ikke høyere enn 70 % for ekspansjon. Før en starter differensiering til adipocytter, blir cellene tillatt å gå til 100 % konfluens; mediet må bli skiftet hver 2. dag. Cellene blir talt og sådd ved 25.000 celler/brønn i en 96 brønn/plate (celler kan også bli plettert på Cytostar-T 96 brønn/plate) og inkubert i ytterligere 48 timer. Differensiering blir induert ved tilsetning av det følgende medium etter fjerning av det tidligere kulturmedium:

DMEM supplementert med 10 % FBS (føtalt kalveserum), 1  $\mu$ M deksametason (DBX), 0,5 mM 3-isobutyl-1-metylxantin (IBMX) og 5  $\mu$ g/ml insulin. En alternativ måte for å indusere differensiering er å behandle cellene med 1  $\mu$ M Rosiglitazon og inkubere i 6 dager før en endrer medium til DMEM/10 % FBS, siden dette er en raskere måte for å indusere 3T3-L1 fibroblaster for å differensiere til adipocytter. En tredje mulighet er å kombinere de to prosedyrene for å forkorte tid for differensiering.

Etter tilsetning av DBX/IBMX/insulinholdig medium til celler, blir cellene inkubert i 48 timer. Mediet blir forandret til DMEM/10 % FBS/5  $\mu$ g/ml insulin, og cellene blir inkubert i 48 timer. Deretter blir mediet forandret til DMEM/10 % FBS og mediet blir erstattet med nytt medium hver 2. dag. Cellene vil differensiere mellom 7-14 dager. Differensierte celler akkumulerer små lipiddråper. Cellene kan bli farget med OIL RED O. Med én gang de 95 % adipocytterne inneholder små lipiddråper, kan cellene bli brukt for glukoseopptaksanalysen.

Differensiert 3T3-L1 blir behandlet med FGF-21 (1  $\mu$ g/ml) i DMEM supplementert med 0,1 % fettsyrefri-BSA i 18 timer for å sulte cellene. Cellene blir så vasket 3 ganger med Krebs-Ringer HEPES buffer (KRH= 0,118 M NaCl, 5 mM KCl, 2,54 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,19 mM MgSO<sub>4</sub> og 20 mM HEPES) supplementert med 0,1 % FAF-BSA. Merkemiksen blir fremstilt ved tilsetning av 4  $\mu$ Ci, 0,1 mM 2-deoksyD-[1-<sup>3</sup>H]-glukose til KRH/0,1 % FAF-BSA buffer. Cellene blir tilsatt og inkubert i 1 time ved 37 °C. Reaksjonen blir stoppet ved å vaske cellene to ganger med is-kald PBS inneholdende 20  $\mu$ M cytochalasin B. Platen blir blottet for å eliminere enhver resterende buffer. Scintillasjonsvæske blir tilsatt til hver brønn og prøver blir talt på en TopCounter.

En alternativ måte for å måle glukoseopptak er å belade de differensierte 3T3-L1 cellene med et ikke-radioaktivt substrat som 2-NBDG og lese av med en fluorescens plateavleser. En indirekte prosedyre for å måle glukoseopptak er å måle ekspresjonen GLUT1 eller GLUT4 på cellemembranoverflaten. GLUT1 og GLUT4 er glukose-transportere som er translokalisert på cellemembranoverflaten fra de interne vesikler etter insulin eller FGF-21 stimulering.

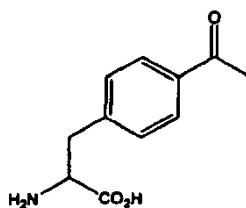
En ELISA på levende celler kan bli utviklet.

### Eksempel 3

Dette eksempelet detaljerer introduksjon av en karbonyl-holdig aminosyre og påfølgende reaksjon med en aminooksy-holdig PEG.

Dette eksempelet demonstrerer en fremgangsmåte for genereringen av et FGF-21 polypeptid som inkorporerer en keton-holdig ikke-naturlig kodet aminosyre som deretter blir reagert med en aminooksy-holdig PEG med omtrent 5.000 MW. Hver av restene før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41,

42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7) blir separat substituert med en ikke-naturlig kodet aminosyre som har den følgende strukturen:



Sekvensene utnyttet for sete-spesifikk inkorporering av p-acetyl-fenylalanin i FGF-21 er SEKV ID NR: 1 (FGF-21), og SEKV ID NR: 16 eller 17 (muttRNA, *M. jannaschii* mtRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub>), og 15, 29, 30 eller 31 (TyrRS LW1, 5, eller 6) beskrevet i Eksempel 2 over.

Med én gang den er modifisert, blir FGF-21 polypeptidvarianten omfattende den karbonyl-holdige aminosyren reagert med et aminooksy-holdig PEG-derivat av formen: R-PEG(N)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-NH<sub>2</sub>

hvor R er metyl, n er 3 og n er omtrent 5.000 MW. Den rensede FGF-21 inneholdende p-acetylphenylalanin oppløst ved 10 mg/ml i 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, eller i 10 mM natriumacetat (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, blir reagert med et 10 til 100-ganger overskudd av aminooksy-holdig PEG, og så omrørt i 10 - 16 timer ved romtemperatur (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, s. 475). PEG-FGF-21en blir så fortynnet i passende buffer for umiddelbar rensing og analyse.

#### Eksempel 4

Konjugering med en PEG bestående av en hydroksylamingruppe knyttet til PEGen via en amidbinding.

En PEG reagens som har den følgende strukturen blir koplet til en keton-holdig ikke-naturlig kodet aminosyre ved anvendelse av prosedyren beskrevet i Eksempel 3:



hvor R = metyl, n=4 og n er omtrent 20.000 MW. Reaksjons-, rense- og analysebetingelsene er som beskrevet i Eksempel 3.



Eksempel 5

Dette eksempelet detaljerer introduksjonen av to distinkte ikke-naturlig kodede aminosyrer til FGF-21 polypeptider.

Dette eksempelet demonstrerer en fremgangsmåte for genereringen av et FGF-21 polypeptid som inkorporerer ikke-naturlig kodet aminosyre omfattende en ketonfunksjonalitet ved to posisjoner blant de følgende restene: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7). FGF-21 polypeptidet blir fremstilt som beskrevet i Eksemplene 1 og 2, unntatt at selektorkodonet blir introdusert ved to distinkte seter innen nukleinsyren.

Eksempel 6

Dette eksempelet detaljerer konjugering av FGF-21 polypeptid til en hydrazidholdig PEG og påfølgende in situ reduksjon.

Et FGF-21 polypeptid som inkorporerer en karbonylholdig aminosyre blir fremstilt ifølge prosedyren beskrevet i Eksemplene 2 og 3. Med én gang den er modifisert, blir en hydrazidholdig PEG som har den følgende strukturen konjugert til FGF-21 polypeptidet:

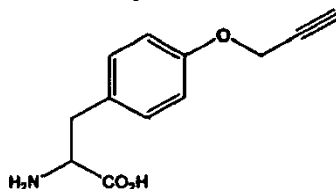


hvor R = metyl, n=2 og N = 10.000 MW og X er en karbonyl (C=O) gruppe. Den rensede FGF-21 inneholdende *p*-acetylfenylalanin blir oppløst ved mellom 0,1-10 mg/ml i 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, eller i 10 mM natriumacetat (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, blir reagert med et 1 til 100-ganger overskudd av hydrazidholdig PEG, og det tilsvarende hydrazonet blir redusert in situ ved addisjon av stock 1M NaCNBH<sub>3</sub> (Sigma Chemical, St. Louis, MO), oppløst i H<sub>2</sub>O, til en sluttkonsentrasjon på 10-50 mM. Reaksjoner blir utført i mørke ved 4 °C til RT i 18-24 timer. Reaksjoner blir stoppet ved tilsetning av 1 M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ved omkring pH 7,6 til en slutt-Tris-konsentrasjon på 50 mM eller fortynnet i passende buffer for umiddelbar rensing.

### Eksempel 7

Dette eksempelet detaljer introduksjon av en alkyn-holdig aminosyre i et FGF-21 polypeptid og derivatisering med mPEG-azid.

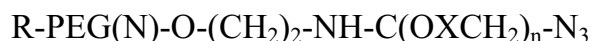
De følgende restene, før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7), blir hver substituert med den følgende ikke-naturlig kodede aminosyren:



Sekvensene utnyttet for sete-spesifikk inkorporering av p-propargyl-tyrosin i FGF-21 er SEKV ID NR: 1 (FGF-21), SEKV ID NR: 16 eller 17 (muttRNA, *M. jannaschii* mtRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub>), og 22, 23 eller 24 beskrevet i Eksempel 2 over. FGF-21 polypeptidet inneholdende propargyltyrosin blir uttrykt i *E. coli* og renset ved anvendelse av betingelsene beskrevet i Eksempel 3.

Den rensede FGF-21 inneholdende propargyl-tyrosin oppløst ved mellom 0,1-10 mg/ml i PB buffer (100 mM natriumfosfat, 0,15 M NaCl, pH = 8) og et 10 til 1000-ganger overskudd av en azid-holdig PEG blir tilsatt til reaksjonsblandingen. En katalytisk mengde av CuSO<sub>4</sub> og Cu vaier blir så tilsatt til reaksjonsblandingen. Etter at blandingen er inkubert (inkludert men ikke begrenset til, omkring 4 timer ved romtemperatur eller 37 °C, eller over natten ved 4 °C), blir H<sub>2</sub>O tilsatt og blandingen blir filtrert gjennom en dialysemembran. Prøven kan bli analysert for addisjonen, inkludert men ikke begrenset til, ved lignende prosedyrer beskrevet i Eksempel 3.

I dette eksemplet, vil PEGen ha den følgende strukturen:

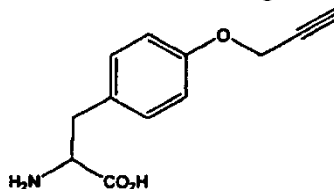


hvor R er metyl, n er 4 og n er 10.000 MW.

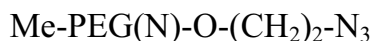
### Eksempel 8

Dette eksempelet detaljerer substitusjon av en stor, hydrofob aminosyre i et FGF-21 polypeptid med propargyltyrosin.

En Phe, Trp eller Tyr rest foreliggende innen én de følgende regioner av FGF-21: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7) blir substituert med den følgende ikke-naturlig kodede aminosyren som beskrevet i Eksempel 7:



Med én gang den er modifisert, blir en PEG festet til FGF-21 polypeptidvarianten omfattende den alkyn-holdige aminosyren. PEGen vil ha den følgende strukturen:

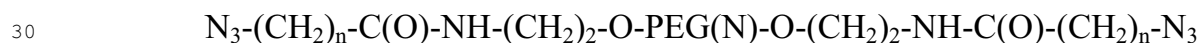


og koplingsprosedyrer ville følge de i Eksempel 7. Dette vil generere en FGF-21 polypeptidvariant omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre som er omtrent isosterisk med én av de naturlig-forekommende, store hydrofobe aminosyrene og som er modifisert med et PEG-derivat ved et distinkt sete innen polypeptidet.

### Eksempel 9

Dette eksempelet detaljerer generering av en FGF-21 polypeptid-homodimer, heterodimer, homomultimer eller heteromultimer adskilt ved én eller flere PEG linkere.

Den alkyn-holdige FGF-21 polypeptidvarianten produsert i Eksempel 7 blir reagert med et bifunksjonelt PEG-derivat av formen:



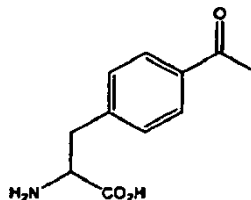
hvor n er 4 og PEGen har en gjennomsnittlig MW på omtrent 5.000, for å generere den tilsvarende FGF-21 polypeptid homodimeren hvor de to FGF-21 molekylerne er fysisk separert ved PEG. På en analog måte kan et FGF-21 polypeptid bli koplet til én eller flere andre polypeptider for å danne heterodimerer, homomultimerer eller heteromultimerer.

Kopling, rensing og analyser vil bli utført som i Eksemplene 7 og 3.

### Eksempel 10

Dette eksempelet detaljerer kopling av en sakkarid-andel til et FGF-21 polypeptid.

Én rest av de følgende er substituert med den ikke-naturlig kodede aminosyren under: før posisjon 1 (dvs. ved N-terminusen), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (dvs. ved karboksylterminusen av proteinet) (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7) som beskrevet i Eksempel 3.

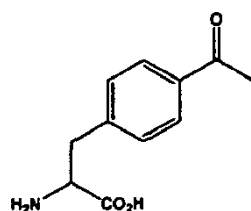


Med én gang den er modifisert, blir FGF-21 polypeptidvarianten omfattende den karbonyl-holdige aminosyren reagert med en  $\beta$ -tilknyttet aminosyranalog av N-acetylglukosamin (GlcNAc). FGF-21 polypeptidvarianten (10 mg/ml) og aminosyrsakkaridet (21 mM) blir blandet i vandig 100 mM natriumacetatbuffer (pH 5,5) og inkubert ved 37 °C i 7 til 26 timer. Et andre sakkarid blir koplet til det første enzymatisk ved inkubering av det sakkarid-konjugerte FGF-21 polypeptidet (5 mg/ml) med UDP-galaktose (16 mM) og  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase (0,4 enheter/ml) i 150 mM HEPES buffer (pH 7,4) i 48 timer ved omgivelsestemperatur (Schanbacher et al. J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061).

### Eksempel 11

Dette eksempelet detaljerer generering av en PEGylert FGF-21 polypeptid-antagonist.

En rest, inkludert men ikke begrenset til, de involvert i FGF-21 reseptorbinding blir substituert med den følgende ikke-naturlig kodede aminosyren som beskrevet i Eksempel 3.



Med én gang den er modifisert, vil FGF-21 polypeptidvarianten omfattende den karbonyl-holdige aminosyren bli reagert med et aminooksy-holdig PEG-derivat av formen: R-PEG(N)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-NH<sub>2</sub> hvor R er metyl, n er 4 og n er 20.000 MW for å generere en FGF-21 polypeptid-antagonist omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre som er modifisert med et PEG-derivat ved et enkelt sete innen polypeptidet. Kopling, rensing og analyser blir utført som i Eksempel 3.

### Eksempel 12

10 Generering av en FGF-21 polypeptid-homodimer, heterodimer, homomultimer eller heteromultimer hvor FGF-21 molekylene er sammenknyttet direkte.

En FGF-21 polypeptidvariant omfattende den alkyn-holdige aminosyren kan bli direkte koplet til en annen FGF-21 polypeptidvariant omfattende den azido-holdige aminosyren. På en analog måte kan et FGF-21 polypeptid polypeptid bli koplet til ett eller flere andre polypeptider for å danne heterodimerer, homomultimerer eller heteromultimerer. Kopling, rensing og analyser blir utført som i eksemplene 3, 6 og 7.

### Eksempel 13



A

B

20 Polyalkylenglykolen (P-OH) blir reagert med alkylhalogenidet (A) for å danne eteren (B). I disse forbindelsene, er n et heltall fra én til ni og R' kan være en lineær- eller forgrenet-kjede, mettet eller umettet C1 til C20 alkyl eller heteroalkylgruppe. R' kan også være en C3 til C7 mettet eller umettet cyklisk alkyl eller cyklisk heteroalkyl, en substituert eller usubstituert aryl eller heteroarylgruppe, eller en substituert eller usubstituert alkaryl (alkyl-en er en C1 til C20 mettet eller umettet alkyl) eller heteroalkarylgruppe. Typisk, er PEG-OH polyetylenglykol (PEG) eller monometoksy polyetylenglykol (mPEG) som har en molekylvekt på 800 til 40.000 Dalton (Da).

### Eksempel 14



mPEG-OH med en molekylvekt på 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) ble behandlet med NaH (12 mg, 0,5 mmol) i THF (35 ml). En løsning av propargylbromid, oppløst som en 80 % vekt løsning i xylene (0,56 ml, 5 mmol, 50 ekv., Aldrich), og en katalytisk mengde KI ble så tilsatt til løsningen og den resulterende blandingen ble varmet til tilbakeløp i 2 timer. Vann (1 ml) ble så tilsatt og løsemidlet ble fjernet under vakuum. Til resten ble det tilsatt CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) og det organiske laget ble separert, tørket over vannfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, og volumet ble redusert til omtrent 2 ml. Denne

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> løsningen ble tilsatt til dietyleter (150 ml) dråpevis. Det resulterende bunnfallet ble samlet, vasket med mange porsjoner kald dietyleter og tørket for å gi propargyl-O-PEG.

#### 5 Eksempel 15



mPEG-OH med en molekylvekt på 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) ble behandlet med NaH (12 mg, 0,5 mmol) i THF (35 ml). Femti ekvivalenter av 5-brom-1-pentyn (0,53 ml, 5 mmol, Aldrich) og en katalytisk mengde KI ble så tilsatt til blandingen. Den resulterende blandingen ble varmet til tilbakeløp i 16 timer. Vann (1 ml) ble så tilsatt og løsemidlet ble fjernet under vakuum. Til resten ble det tilsatt CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) og det organiske laget ble separert, tørket over vannfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, og volumet ble redusert til omtrent 2 ml. Denne CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> løsningen ble tilsatt til dietyleter (150 ml) dråpevis. Det resulterende bunnfallet ble samlet, vasket med mange porsjoner kald dietyleter, og tørket for å gi det tilsvarende alkynet. 5-klor-1-pentyn kan bli brukt i en lignende reaksjon.

#### Eksempel 16

- (1)  $m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} + \text{NaOH} + \text{Br-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
- 20 (2)  $m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{MsCl} + \text{N}(\text{Et})_3 \rightarrow m\text{-MsOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
- (3)  $m\text{-MsOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{LiBr} \rightarrow m\text{-Br-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
- (4)  $\text{mPEG-OH} + m\text{-Br-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow \text{mPEG-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$

Til en løsning av 3-hydroksybenzylalkohol (2,4 g, 20 mmol) i THF (50 ml) og vann (2,5 ml) ble det først tilsatt pulverisert natriumhydroksid (1,5 g, 37,5 mmol) og så en løsning av propargylbromid, oppløst som en 80 % vekt løsning i xylen (3,36 ml, 30 mmol). Reaksjonsblandingen ble varmet ved tilbakeløp i 6 timer. Til blandingen ble det tilsatt 10 % sitronsyre (2,5 ml) og løsemidlet ble fjernet under vakuum. Resten ble ekstrahert med etylacetat (3 x 15 ml) og de kombinerte organiske lagene ble vasket med mettet NaCl løsning (10 ml), tørket over MgSO<sub>4</sub> og konsentrert for å gi 3-propargyloksybenzyl-alkoholen.

Metansulfonylchlorid (2,5 g, 15,7 mmol) og trietylamin (2,8 ml, 20 mmol) ble tilsatt til en løsning av forbindelse 3 (2,0 g, 11,0 mmol) i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ved 0 °C og reaksjonen ble plassert i kjøleskapet i 16 timer. En vanlig opparbeidelse ga mesylatet som en blekgul olje. Denne oljen (2,4 g, 9,2 mmol) ble oppløst i THF (20 ml) og LiBr (2,0 g, 23,0 mmol) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble varmet til tilbakeløp i 1 time og ble så avkjølt til romtemperatur. Til blandingen ble det tilsatt vann (2,5 ml) og løsemidlet ble fjernet under vakuum. Resten ble ekstrahert med etylacetat (3 x 15 ml) og de kombinerte organiske

lagene ble vasket med mettet NaCl løsning (10 ml), tørket over vannfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, og konsentrert for å gi det ønskede bromidet.

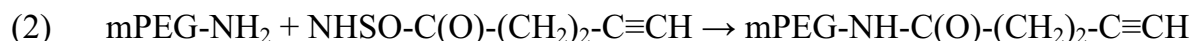
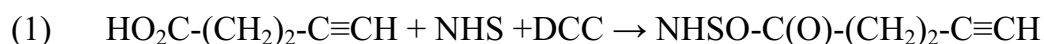
mPEG-OH 20 kDa (1,0 g, 0,05 mmol, Sunbio) ble oppløst i THF (20 ml) og løsningen ble avkjølt i et isbad. NaH (6 mg, 0,25 mmol) ble tilsatt med kraftig omrøring over en periode på flere minutter fulgt av tilsetning av det oppnådde bromidet fra over (2,55 g, 11,4 mmol) og en katalytisk mengde KI. Kjølebadet ble fjernet og den resulterende blandingen ble varmet til tilbakeløp i 12 timer. Vann (1,0 ml) ble tilsatt til blandingen og løsemidlet ble fjernet under vakuum. Til resten ble det tilsatt CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) og det organiske laget ble separert, tørket over vannfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, og volumet ble redusert til omtrent 2 ml. Dråpevis tilsetning til en eterløsning (150 ml) resulterte i et hvitt bunnfall, som ble samlet for å gi PEG-derivatet.

### Eksempel 17



De terminal alkyn-holdige poly(etylenglykol) polymerene kan også bli oppnådd ved kopling av en poly(etylenglykol) polymer inneholdende en terminal funksjonell gruppe til et reaktivt molekyl inneholdende alkynfunksjonaliteten som vist over. n er mellom 1 og 10. R' kan være H eller en liten alkylgruppe fra C1 til C4.

### Eksempel 18

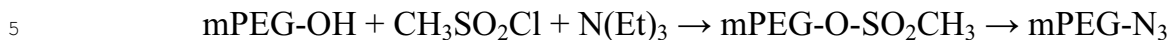


4-pentynsyre (2,943 g, 3,0 mmol) ble oppløst i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml). N-hydrokysuccinimid (3,80 g, 3,3 mmol) og DCC (4,66 g, 3,0 mmol) ble tilsatt og løsningen ble omrørt over natten ved romtemperatur. Den resulterende ubearbeidede NHS-esteren 7 ble brukt i den følgende reaksjonen uten videre rensing.

mPEG-NH<sub>2</sub> med en molekylvekt på 5.000 Da (mPEG-NH<sub>2</sub>, 1 g, Sunbio) ble oppløst i THF (50 ml) og blandingen ble avkjølt til 4 °C. NHS ester 7 (400 mg, 0,4 mmol) ble tilsatt porsjonsvis med kraftig omrøring. Blandingene ble tillatt å omrøres i 3 timer mens en varmer til romtemperatur. Vann (2 ml) ble så tilsatt og løsemidlet ble fjernet under vakuum. Til resten ble det tilsatt CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) og det organiske laget ble separert, tørket over vannfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, og volumet ble redusert til omtrent 2 ml. Denne CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> løsningen ble tilsatt til eter (150 ml) dråpevis. Det resulterende bunnfallet ble samlet og tørket in vacuo.

### Eksempel 19

Dette eksempelet representerer fremstillingen av metansulfonylesteren av poly(etylenglykol), som også kan bli referert til som metansulfonatet eller mesylatet av poly(etylenglykol). Det tilsvarende tosylatet og halogenidene kan bli fremstilt ved lignende prosedyrer.



mPEG-OH (MW = 3.400, 25 g, 10 mmol) i 150 ml toluen ble azeotropisk destillert i 2 timer under nitrogen og løsningen ble avkjølt til romtemperatur. 40 ml tørr  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  og 2,1 ml tørr trietylamin (15 mmol) ble tilsatt til løsningen. Løsningen ble avkjølt i et isbad og 1,2 ml destillert metansulfonylchlorid (15 mmol) ble tilsatt dråpevis. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur under nitrogen over natten, og reaksjonen ble quenched ved tilsetning av 2 ml absolutt etanol. Blandingen ble dampet inn under vakuu for å fjerne løsemidler, primært de andre enn toluen, filtrert, konsentrert igjen under vakuu, og så utfelt i 100 ml dietyleter. Filtratet ble vasket med mange porsjoner kald dietyleter og tørket in vacuo for å gi mesylatet.

15 Mesylatet (20 g, 8 mmol) ble oppløst i 75 ml THF og løsningen ble avkjølt til 4 °C. Til den avkjølte løsningen ble det tilsatt natriumazid (1,56 g, 24 mmol). Reaksjonen ble varmet til tilbakeløp under nitrogen i 2 timer. Løsemidlene ble så dampet inn og resten fortynnet med  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml). Den organiske fraksjonen ble vasket med NaCl løsning og tørket over vannfri  $\text{MgSO}_4$ . Volumet ble redusert til 20 ml og produktet ble utfelt ved tilsetning til 150 ml kald tørr eter.

### Eksempel 20



4-azidobenzylalkohol kan bli produsert ved anvendelse av fremgangsmåten beskrevet i U.S. patent 5,998,595. Metansulfonylchlorid (2,5 g, 15,7 mmol) og trietylamin (2,8 ml, 20 mmol) ble tilsatt til en løsning av 4-azidobenzylalkohol (1,75 g, 11,0 mmol) i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ved 0 °C og reaksjonen ble plassert i kjøleskapet i 16 timer. En vanlig opparbeidelse ga mesylatet som en blekgul olje. Denne oljen (9,2 mmol) ble oppløst i THF (20 ml) og LiBr (2,0 g, 23,0 mmol) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble varmet til tilbakeløp i 1 time og ble så avkjølt til romtemperatur. Til blandingen ble det tilsatt vann (2,5 ml) og løsemidlet ble fjernet under vakuu. Resten ble ekstrahert med etylacetat (3 x 15 ml) og de kombinerte organiske lagene ble vasket med mettet NaCl løsning (10 ml), tørket over vannfri  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , og konsentrert for å gi det ønskede bromidet.

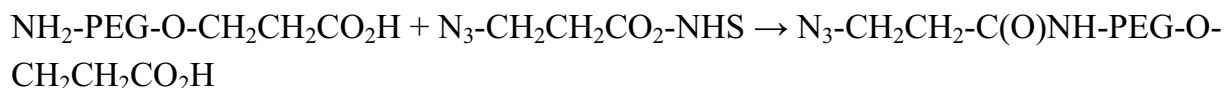
35 mPEG-OH 20 kDa (2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) ble behandlet med NaH (12 mg, 0,5 mmol) i THF (35 ml) og bromidet (3,32 g, 15 mmol) ble tilsatt til blandingen sammen med en katalytisk mengde KI. Den resulterende blandingen ble varmet til tilbakeløp i 12 timer. Vann (1,0 ml) ble tilsatt til blandingen og løsemidlet ble fjernet under vakuu. Til



resten ble det tilsatt CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) og det organiske laget ble separert, tørket over vannfri Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, og volumet ble redusert til omtrent 2 ml. Dråpevis tilsetning til en eterløsning (150 ml) resulterte i et bunnfall, som ble samlet for å gi mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>.

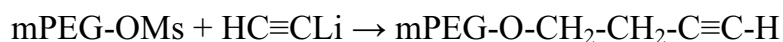
5

#### Eksempel 21



NH<sub>2</sub>-PEG-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H (MW 3.400 Da, 2,0 g) ble oppløst i en mettet vandig  
 10 løsning av NaHCO<sub>3</sub> (10 ml) og løsningen ble avkjølt til 0 °C. 3-azido-1-N-hydroksey-succinimidopropionat (5 ekviv.) ble tilsatt med kraftig omrøring. Etter 3 timer, ble 20 ml H<sub>2</sub>O tilsatt og blandingen ble omrørt i ytterligere 45 minutter ved romtemperatur. pH-en ble regulert til 3 med 0,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og NaCl ble tilsatt til en konsentrasjon på omtrent 15 vekt-%. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml x 3), tørket over  
 15 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og konsentrert. Etter utfelling med kald dietyleter, ble produktet samlet ved filtrering og tørket under vakuum for å gi omega-karboksy-azid PEG-derivatet.

#### Eksempel 22



20 Til en løsning av litiumacetylid (4 ekviv.), fremstilt som kjent innen faget og avkjølt til -78 °C i THF, blir det tilsatt dråpevis en løsning av mPEG-OMs oppløst i THF med kraftig omrøring. Etter 3 timer, blir reaksjonen tillatt å varmes til romtemperatur og quenched med tilsetningen av 1 ml butanol. 20 ml H<sub>2</sub>O blir så tilsatt og blandingen ble omrørt i ytterligere 45 minutter ved romtemperatur. pH-en ble regulert til 3 med 0,5 N  
 25 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og NaCl ble tilsatt til en konsentrasjon på omtrent 15 vekt-%. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml x 3), tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og konsentrert. Etter utfelling med kald dietyleter, ble produktet samlet ved filtrering og tørket under vakuum for å gi 1-(but-3-ynyloksy)-metoksy-polyetylen-glykol (mPEG).

#### Eksempel 23

30 Azid- og acetylen-holdige aminosyrer kan bli inkorporert sete-selektivt til proteiner ved anvendelse av fremgangsmåtene beskrevet i L. Wang, et al., (2001), Science 292:498-500, J.W. Chin et al., Science 301:964-7 (2003)), J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), Chem  
 35 Bio Chem 3(11):1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024; og L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1:1-11. Med én gang aminosyrene var inkorporert, blir sykloadisjonsreaksjonen utført med 0,01 mM

protein i fosfatbuffer (PB), pH 8, i nærvær av 2 mM PEG-derivat, 1 mM CuSO<sub>4</sub>, og ~1 mg Cu-vaier i 4 timer ved 37 °C.

#### Eksempel 24

5 Dette eksempelet beskriver syntesen av p-Acetyl-D,L-fenylalanin (pAF) og m-PEG-hydroksylaminderivater.

Den racemiske pAF blir syntetisert ved anvendelse av den tidligere beskrevne prosedyren i Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P. G., *Biochemistry*, (2003) 42, 6735-6746 .

10 For å syntetisere m-PEG-hydroksylaminderivatet, blir de følgende prosedyrer fullført. Til en løsning av (N-t-Boc-aminooksy)eddiksyre (0,382 g, 2,0 mmol) og 1,3-diisopropylkarbodiimid (0,16 ml, 1,0 mmol) i diklormetan (DCM, 70 ml), som blir omrørt ved romtemperatur (RT) i 1 time, blir metoksy-polyetylenglykolamin (m-PEG-NH<sub>2</sub>, 7,5 g, 0,25 mmol, Mt. 30 K, fra BioVectra) og diisopropyletylamin (0,1 ml, 0,5 mmol) tilsatt. 15 Reaksjonen blir omrørt ved RT i 48 timer, og blir så konsentrert til omkring 100 ml. Blandingen blir tilsatt dråpevis til kald eter (800 ml). Det t-Boc-beskyttede produktet felte ut og blir samlet ved filtrering, vasket med eter 3x100 ml. Det blir videre rensed ved gjentatt oppløsning i DCM (100 ml) og utfelling i eter (800 ml) to ganger. Produktet blir tørket i vakuum for å gi 7,2 g (96 %), bekreftet ved NMR og Nihydrin test.

20 "deBoc-en" av det beskyttede produktet (7,0 g) oppnådd over blir utført i 50 % TFA/DCM (40 ml) ved 0 °C i 1 time og så ved RT i 1,5 time. Etter fjerning av det meste av TFA i vakuum, blir TFA-saltet av hydroksylaminderivatet omformet til HCl saltet ved tilsetning av 4N HCl i dioksan (1 ml) til resten. Bunnfallet blir oppløst i DCM (50 ml) og på nytt utfelt i eter (800 ml). Sluttproduktet (6,8 g, 97 %) blir samlet ved filtrering, vasket 25 med eter 3x 100 ml, tørket i vakuum, lagret under nitrogen. Andre PEG (5K, 20K) hydroksylaminderivater blir syntetisert ved anvendelse av den samme prosedyren.

#### Eksempel 25

##### Analyse av ERK1/2 fosforylering induisert ved FGF-21 WT og 30K PEG analoger:

30 Så 293-stabilt transfektert med human Klotho beta ved 100.000 celler/brønn (DMEM+10 % FBS) i en poly-Lys belagt plate. Den følgende dagen er celler 100 % konfluente, medier blir suget av og erstattet med nye medier og inkuber over natten. Etter 24 timer blir celler stimulert med de passende 30K PEG FGF-21 analoger ved å anvende som standard FGF21WT. Hver individuelle forbindelse blir fremstilt ved å fortynne dem i 35 PBS/1 % BSA. Celler blir behandlet i triplikat i 10 min @37° C i inkubatoren. Etter 10 min blir inkuberingsmedier forsiktig suget av fra hver brønn og 40 ul kald 1x celle-signalerings lysisbuffer inneholdende protease/fosfatase inhibitorer (PI cocktail, Na3VN4 og PMSF) blir tilsatt til hver brønn for å tilvirke cellelysater. 96 brønn/plate blir plassert

på is i 20 minutter og deretter sentrifugert ned ved 4000 rpm i 10 min. Cellelysater blir frosset ned @ -80° C. Senere blir hver prøve tinet opp og 10 ul cellelysater blir tilsatt til MSD behandlet plate belagt med antistoff som fanger både de ufosforylerte og fosforylerte formene av ERK1/2. Inkubering med primært antistoff forekommer i 2 timer, deretter blir plate vasket mange ganger med spesifikk buffer fulgt av tilsetning av sekundært antistoff. Etter 1 time inkubering blir plate vasket igjen mange ganger. Buffer for avlesing blir tilsatt til hver brønn. Plate blir overført til MSD avlesingsmaskin. Kurven som blir produsert er basert på de anti-fosforylerte ERK1/2 avlesingsenhetene og EC50 blir beregnet ved anvendelse av Sigma Plot. Foldetapet av aktivitet blir beregnet ved å dividere EC50 av den 30 K PEGylerte spesifikke forbindelsen med EC50 av WT.

#### Eksempel 26: Cellulær ERK 1/2 fosforyleringsanalyse (pERK) protokoll og MSD analyse

293 βKlotho-4 celler ble opprettholdt i DMEM+10 % FBS+P/S+0,5 mg/ml Geneticin. Når cellene nådde 50-90 % konfluens, ble de trypsinisert og sådd 100.000 celler/brønn i poly-D-lys belagte 96-brønnplater i DMEM+10 %FBS+P/S.

Den følgende dagen når cellene var ~100 % konfluente, ble de kontrollert for å være sikkert på at mediene fremdeles var røde, så ble mediene suget av 200 ul/brønn av serielle fortyninger av FGF-21 varianter (i PBS+1 % BSA) ble pipettert til 96-brønnplaten. 96-brønnplaten ble så plassert i 37 °C, 5 % CO2 inkubator i nøyaktig 9 minutter. FGF-21 behandlingene ble så komplett suget av og 40 ul/brønn av ny-laget 1xcellesignalerings lysisbuffer+1x Sigma proteaseinhibitor cocktail + 2 mM natrium-ortovanadat + 1 mM PMSF + 1x MSD fosfataseinhibitor I +1x MSD fosfataseinhibitor II + 1x MSD proteaseinhibitor Cocktail+ 2mM MSD PMSF ble tilsatt. Skålen ble plassert på is, og satt til side i 25 minutter, mens en pipetterer hver brønn opp og ned med en P20 pipette for å blande lysatene. Etter blanding av brønnene, plasser hele isbøtten og skålen på 4C rister i resten av tiden. Etter 25 minutter, sentrifuger ned platen ved 4000 rpm, 10 min, ved 4C. Overfør supernatantene til en kald rund-bunn 96-brønnplate på is.

#### MSD Analyse

Denne analysen ble utført ved anvendelse av Meso Scale Discovery MULTI-SPOT analysesystemet hel-cellelysate kit Phospho (T/Y 202/204; 185/187)/Total - ERK1/2/Analysen.

Alle MSD reagenser ble tinet til romtemperatur og alle nødvendige buffere ble laget ifølge kit-instruksjoner. Til hver brønn, ble 150 ul av Blocker A tilsatt til en phosphoERK-totalERK dupleksplate og den ble tillatt å blokkere i 1 hr ved romtemperatur på en rister. Platen ble så vasket 4x med 160 ul/brønn av 1x vaskebuffer. 16 ul/brønn av lysisbuffer + protease- og fosfataseinhibitorer (laget tidligere for cellestimuleringene) ble tilsatt og 10 ul/brønn ble overført fra den kalde lysat

supernatantplaten til MSD platebrønnene (totalt volum ble så 26 ul/brønn). MSD platen inkubert i 3 hrs ved romtemperatur på en rister platen ble så vasket 4x med 160 ul/brønn av 1x vaskebuffer. 25 ul/brønn av deteksjonsantistoff (fortynnet 50x i antistoff fortynningsbuffer) ble tilsatt og satt for å inkubere i 1 hr ved romtemperatur på en rister.

5 Platen ble igjen vasket 4x med 160 ul/brønn av 1x vaskebuffer og 150 ul/brønn av 1x lesebuffer T ble tilsatt etter dette ble platen umiddelbart lest på MSD Sector Imager 2400 maskin.

### BCA Kvantifisering

10 Pierce BCA Proteinanalysekitet ble brukt. BSA standard ble fortynnet i en 96-brønnplate fra en toppkonsentrasjon på 2 mg/ml, med 2x fortynninger ned kolonnene i 1x cellesignalerings lysisbuffer. (siste sett av brønner var buffer, ingen BSA) 25 ul/brønn av BSA standardene ble pipettert i duplikat til to MaxiSorp 96-brønnplater. 3x fortynninger av lysater ble gjort i 1x cellesignalerings lysisbuffer og 25 ul/brønn ble tilsatt til MaxiSorp

15 platene. Arbeidsreagensen ble dannet ifølge Pierce Kit instruksjonsarket 200 ul ble pipettert til hver brønn i MaxiSorp platene. Platene inkubert ved romtemperatur og ble lest ved  $\lambda = 562$  nm på plateavleseren.

### Dataanalyse

20 Konsentrasjonene ble beregnet for alle lysater med BCA kitet. Når lysater er alle lignende i konsentrasjon, så ikke normaliser for MSD analysen. For MSD analyse, beregn gjennomsnitt av replikatpunkter, beregn standardavvik og CV verdier. Bruk SigmaPlot for å beregne EC50 verdiene for serielle fortynninger av FGF-21 varianter, og bruk ganger over WT EC50 som rangeringskriteriene for variantene. Resultater kan sees i Figur 7a og

25 7b av denne søknaden.

### Eksempel 27: FGF-21 utagget nedstrømsprosess

#### Inklusjonslegeme prep solubilisering

Cellepasta ble resuspendert ved blanding til en endelig 10 % faststoff i 4 °C

30 inklusjonslegeme (IB) Buffer I (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 4 °C). Celler ble lysert ved å passere resuspendert materiale gjennom en mikrofluidiserer totalt to ganger, så ble det sentrifugert (10.000 g; 15 min; 4 °C) og supernatanten ble dekantert. IB pelleten ble vasket ved å resuspendere i et ytterligere volum IB buffer I (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100;

35 4 °C) og resuspendert materiale ble passert gjennom mikrofluidiserer totalt to ganger, så ble det sentrifugert (10.000 g; 15 min; 4 °C) og supernatanten ble dekantert. IB pelleten ble resuspendert i ett volum buffer II (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4 °C), så ble den sentrifugert (10.000 g; 15 min; 4 °C) og supernatanten ble dekantert. IB

pellet ble så resuspendert i ½ volum buffer II (50 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4 °C). IB ble delt i like deler i passende beholdere, så ble den sentrifugert (10.000 g; 15 min; 4 °C) og supernatanten ble dekantert. Inklusjonslegemer ble solubilisert (dette er punktet hvor de ellers kunne bli lagret ved -80 °C inntil videre bruk.)

5

### Inklusjonslegemesolubilisering

Inklusjonslegemer ble solubilisert til en sluttkonsentrasjon mellom 10-15 mg/ml i solubiliseringsbuffer (20 mM Tris, pH 8,0; 8 M Urea; 10 mM β-ME) og inkuberte solubilisert IB ved romtemperatur under konstant blanding i 1 time. Uløselig materiale ble fjernet ved filtrering (0,45 μm PES filter) og proteinkonsentrasjonen ble regulert (ikke alltid nødvendig) ved fortytning med ytterligere solubiliseringsbuffer (når proteinkonsentrasjon er høy).

10

### Refold

15

Refoldet ved fortytning til en sluttproteinkonsentrasjon på 0,5 mg/ml i 20 mM Tris, pH 8,0; 4 °C. Tillatt å refolde i 18 til 24 timer ved 4 °C.

### Rensing

20

Filtrerte refoldreaksjon gjennom et 0,45 μm PES filter. Fylte materiale over en Q HP kolonne (GE Healthcare) brakt til likevekt i Buffer A (20 mM Tris, pH 7,5). Eluerte FGF-21 med en lineær gradient over 20CV til 100 % Buffer B (20 mM Tris, pH 7,5; 250 mM NaCl). Samlet monomer FGF-21.

### PEGylering og rensing

25

Tok Q HP pool og bufferskifting til 20 mM Tris, pH 8,0; 2 M urea; 1 mM EDTA. Falt pH til 4,0 med 50 % iseddik. Konsentrer prøve ned til 4,0 ± 1,0 mg/ml. Tilsett 12:1 molart overskudd PEG og en sluttkonsentrasjon av 1 % eddiksyre hydrazid, pH 4,0 til prøve. Inkuber ved 28 °C i 48-72 timer. Tilsett endelig 50 mM Tris base til PEG-reaksjon og fortynn 10 ganger med RO vann. Forsikre seg om at konduktivitet er <1 mS/cm og pH er mellom 8,0-9,0. Fyll materiale over en Source 30Q kolonne (GE Healthcare) brakt til likevekt i Buffer A (20 mM Tris, pH 8,0). Eluere PEG-FGF-21 med en lineær gradient over 20CV til 100 % B (20 mM Tris, pH 8,0; 100 mM NaCl). Samle PEG-FGF-21 og bufferutskifting til 20 mM Tris, pH 7,4; 150 mM NaCl. Konsentrer PEG materiale mellom 1-2 mg/ml og filtersteriliser ved anvendelse av 0,22 μm PES filter. Lagre ved 4 °C. For forlenget lagring, flashfrys og lagre ved -80 °C.

30

35

### Eksempel 28

### Farmakokinetiske egenskaper av FGF-21 forbindelser i rotter

Denne protokollen ble brukt for å tilveiebringe data (funnet i figurene 11-23) på de farmakokinetiske egenskapene av naturlige og PEG-modifiserte FGF-21 forbindelser produsert ved Ambrx's patenterte teknologi i kateteriserte rotter. Farmakokinetikken for testartikler ble analysert ved ELISA spesifikk for human FGF-21 fra serumprøver oppnådd ved spesifikke tidspunkter etter legemiddeldosering.

#### Testartikler:

1. Ambrx forbindelse PEG-R77 FGF-21 vil bli brukt ved 0,25 mg/ml fortynnet i 1X PBS.
2. Ambrx forbindelse PEG-Y104 FGF-21 vil bli brukt ved 0,25 mg/ml fortynnet i 1X PBS.
3. Ambrx forbindelse PEG-R126 FGF-21 vil bli brukt ved 0,25 mg/ml fortynnet i 1X PBS.

#### Testartikkel kvalitet / formulering:

Stock konsentrasjoner=

1,0 mg/ml PEG-R77 FGF-21

1,16 mg/ml PEG-Y104 FGF-21

1,08 mg/ml PEG-R126 FGF-21

#### Dyr:

Tolv (12) hann Sprague-Dawley (SD) rotter som veier omtrent 250-275 gram ved studieinitiering ville ha hatt halsvenekatetere kirurgisk plassert før de kommer til Ambrx. Dyrene ble mottatt fra CRL i god tilstand og vil ha akklimatisert til studielokaliseringen i minst 3 dager før starten av studien. Rotter vil bli veid på dagen for testartikkeladministrasjon. Dyrene vil bli huset i standard, patogen-frie betingelser med mat og vann ad libitum.

#### Dyregrupper: Alle forbindelser vil bli administrert subkutan

Gruppe 1 (n=4): PEG-R77 SC injeksjon (0,25 mg/kg).

Gruppe 2 (n=4): PEG-Y104 SC injeksjon (0,25 mg/kg).

Gruppe 3 (n=4): PEG-R126 SC injeksjon (0,25 mg/kg).

Dyrene blir veid før administrasjon av testartikkel. Forbindelser blir formulert for å bli administrert ved 1X BW i  $\mu$ l. Subkutan administrasjon av testartikkel blir injisert til den dorsale skulderbladregionen. Dyrene vil motta en enkeltinjeksjon av testartikkel (tid=0). Ved spesifikke tidspunkter (se under), vil helblod bli tappet fra dyrene, samlet i SST mikrotainer prøvetakningsrør. Serum vil bli tillatt å koagulere i 30 minutter før

sentrifugering. Serum vil bli overført til polypropylen titerrør, forseglet med mikrostrips, og lagret ved -800C inntil analysert ved ELISA for å bestemme FGF-21 serumkonsentrasjoner.

5 Datasamling / sluttpunkt:

Hvert dyr vil bli brukt i et komplett PK tidsforløp. Omtrent 0,25 ml helblod vil bli tatt fra halsvenekateterne. Umiddelbart etter blodprøvetakningen, vil kateterne bli skylt med 0,1 ml saltløsning. De følgende samlingstidspunkter for dyr som mottar test-artikkelmateriale er krevet basert på den forventede farmakokinetiske profilen av

10 testartiklene:

Forhånds-blodtapping, 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 56, 72 og 96 timer etter-dose.

Terminering:

Alle dyrene vil bli eutanisert etter fullførelsen av studien

15

Resultater:

Resultater er gitt i tabellen under og i figurene som ledsager denne søknaden.

FGF21 PEG Isomer PK egenskaper-IV

PEG 30K Isomer	Intravenøst 0,25 mg/kg								
		R72	R77	H87	E91	Y104	E110	R126	P146
Lambda_z	l/hr	0,057		0,043			0,044		0,052
Lambda_z_nedre	hr	8		8			8		8
Lambda_z_øvre	hr	48		48			48		48
HL_Lambda_z	hr	12,27		16,44			15,61		13,67
Tmaks	hr	0,25		0,25			0,25		0,3125
Cmaks	ng/ml	5998,6		5802,3			7821,4		8655,8
C0	ng/ml	6861,4		6662,5			9280,1		9149,9
AUCINF_obs	hr*ng/ml	53714,9		52962,1			69435,8		86554,6
Vz_obs	ml/kg	82,46		113,10			81,65		58,06
Cl_obs	ml/hr/kg	4,65		4,74			3,61		2,92
MRTINF_obs	hr	14,49		13,81			16,18		14,83

PEG 30K Isomer	Intravenøst 0,25 mg/kg								
		R72	R77	H87	E91	Y104	E110	R126	P146
Vss_obs	ml/kg	67,46		65,53			58,53		43,48

FGF21 PEG Isomer PK egenskaper-SC

PEG 30K Isomer	Subkutan 0,25 mg/kg								
		R72	R77	H87	E91	Y104	E110	R126	P146
Lambda_z	1/hr			0,043	0,035				0,0317
Lambda_z_nedre	hr	24		24	24				24
Lambda_z_øvre	hr	96		90	96				96
HL_Lambda_z	hr	14,72		16,14	19,93				22,01
Tmaks	hr	24		24	22				24
Cmaks	ng/ml	254,5		174,3	229,7				321,3
AUCINF_obs	hr*ng/ml			8206,7	12177,2				15908,4
Vz_obs	ml/kg	458,9		731,1	606,2				503,4
Cl_obs	ml/hr/kg	21,92		31,67	20,91				15,86
MRTINF_obs	hr	36,52		36,31	40,35				40,07
<p>Øket Tmaks av PEGylerte forbindelser  Øket T1/2 av PEGylerte forbindelser  Øket AUC av PEGylerte forbindelser  PEGylering sete-avhengig PK kjennetegn</p>									

Eksempel 29

5 In vivo studier av PEGylert FGF-21

PEG-FGF-21, umodifisert FGF-21 og bufferløsning blir administrert til mus eller rotter. Resultatene vil vise overlegen aktivitet og forlenget halveringstid av den PEGylerte FGF-21 ifølge foreliggende oppfinnelse sammenlignet med umodifisert FGF-21. På lignende måte, blir modifisert FGF-21, umodifisert FGF-21 og bufferløsning administrert til mus eller rotter.

10



## Farmakokinetisk analyse

WO 2005/091944 beskriver farmakokinetiske studier som kan bli utført med FGF-21 forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse. Et FGF-21 polypeptid ifølge oppfinnelsen blir administrert ved intravenøse eller subkutane ruter til mus. Dyrene blir tappet for blod før og ved tidspunkter etter dosering. Plasma blir samlet fra hver prøve og analysert ved radioimmunoanalyse. Elimineringshalveringstid kan bli beregnet og sammenlignet mellom FGF-21 polypeptider omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre og vill-type FGF-21 eller ulike former av FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen. På lignende måte, kan FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen bli administrert til makakaper. Dyrene blir tappet for blod før og ved tidspunkter etter dosering. Plasma blir samlet fra hver prøve og analysert ved radioimmunoanalyse.

Polypeptider ifølge oppfinnelsen kan bli administrert til ZDF hannrotter (diabetiske, fete rotter; 8 ukers alder ved begynnelse av studie, Charles River-GMI). Rotter blir matet Purina 5008 fôr ad libitum. De følgende testgruppene blir satt opp: Saltløsning; insulin 4U/dag; FGF-21, 500 ug/dag akutt (akutt doseringsgruppe blir dosert én gang og tappet for blod ved T = 0, 2, 4, 8 og 24 timer etter dose); FGF-21, 100 ug/dag; FGF-21, 250 ug/dag; FGF-21, 500 ug/dag; FGF-21(én gang/dag) 500 ug/ml; mager saltløsning; mager insulin 4 U/dag; mager FGF-21 500 ug/dag. Magre grupper representerer ikke-diabetiske, magre, ZDF rotter.

Forbindelser blir injisert s.c. (b.i.d.), unntatt for den andre 500 ug/dag gruppen som mottar én injeksjon per dag for varigheten av studien (7 dager). Kontrollrotter blir injisert med vehikkel (PBS; 0,1 ml). Etter 7 dager med dosering, blir dyrene underkastet en oral glukosetoleransetest. Blod for glukose og triglyserider blir samlet ved halekutt-blodtapping uten bedøvelse. FGF-21 polypeptider kan redusere plasmaglukosenivåer på en dose-avhengig måte. Også magre ZDF rotter trenger ikke bli hypoglykemiske etter eksponering for FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen sammenlignet med rotter dosert med insulin.

### ob/ob obesitetsmodell

ob/ob musemodellen er en dyremodell for hyperglykemi, insulinresistens og obesitet. Plasmaglukosenivåer etter behandling med FGF-21 polypeptid sammenlignet med vehikkel og insulinkontrollgrupper kan bli målt i ob/ob mus. I denne obesitetsmodellen, blir testgruppene av hann ob/ob mus (7 uker gamle) injisert med vehikkel alene (PBS), insulin (4 U/dag) eller FGF-21 polypeptid (5 µg/dag og 25 µg/dag), subkutant (0,1 ml, b.i.d) i syv dager. Blod blir samlet ved halekutt blodtapping på dager 1, 3 og 7, én time etter den første forbindelsesinjeksjonen og plasmaglukosenivåer blir målt ved anvendelse av en standardprotokoll. FGF-21 polypeptider ifølge oppfinnelsen stimulerer glukoseopptak hvis de reduserer plasmaglukosenivåer sammenlignet med vehikkelkontrollgruppen. Triglyseridnivåer kan bli sammenlignet etter behandling med FGF-21

polypeptider ifølge oppfinnelsen sammenlignet med andre molekyler. Polypeptidet kan bli administrert musene via mange doser, kontinuerlig infusjon eller en enkeltdose, etc.

### Eksempel 30

5 Farmakokinetisk evaluering av FGF21 analoger: De farmakokinetiske egenskapene av 30KPEG-pAF(N6-His)FGF21 analoger med varierende seter for PEG-konjugering ble evaluert i rotte. Andre studerte parametere var PEG MW, så vel som dose av administrert forbindelse. Den prosentvise biologiske tilgjengeligheten for noen få 30KPEG-pAF(N6-His)FGF21 varianter ble bestemt.

10 Dyr: Alle dyreforsøk ble gjennomført under protokoller godkjent ved the Institutional Animal Care and Use Committee. Hann (175-300 g) Sprague-Dawley rotter ble oppnådd fra Charles River Laboratories. Rotter ble huset individuelt i bur i rom med en 12-h lys/mørke syklus og akklimatisert til Ambrx vivariet i minst 3 dager før forsøk.  
15 Dyr fikk adgang til sertifisert Purina gnagerfôr 5001 og vann ad libitum.

Dosering og serumsamling: Katetere ble kirurgisk installert i halsvenen for blodsamling ved CRL før skipning. Etter vellykket kateteråpenhet, ble dyrene fordelt i behandlingsgrupper før dosering. En enkeltdose av forbindelse ble administrert  
20 intravenøst eller subkuttant i et dosevolum på 1 ml/kg. Forbindelsesdose-konsentrasjoner ble avledet ved fortykning i PBS ved anvendelse av stock konsentrasjonen som anvist i frigivingssertifikatet. Blodprøver ble samlet ved ulike tidspunkter via det intravenøse kateteret og plassert i SST mikrofugerør. Serum ble samlet etter sentrifugering, og lagret ved -80 °C inntil analyse.

25 Farmakokinetikkanalyse: Analysen for kvantifisering av PEG-FGF-21 i Sprague-Dawley rotteserum ble utviklet ved Ambrx Inc., La Jolla, CA. Mikroplatebrønner blir belagt med geite-anti-humant FGF-21 IgG polyklonalt antistoff (PAb; RnD Systems, klon AF2539) som blir brukt som fangereagensen. Standard (STD) og  
30 kvalitetskontroll (QC) prøver, begge laget ved anrikning av PEG-FGF-21 analog til 100 % Sprague Dawley rotteserum, og studieprøver blir fylt inn i brønnen etter for-behandling 1:100 med I-blokkeringsbuffer. FGF-21en i STDene, QCer og studieprøver blir fanget ved den immobiliserte PAb. Ubundne materialer blir fjernet ved vasking av brønnene. Biotin geite anti-human FGF-21 IgG PAb (RnD Systems, klon BAF2539) blir tilsatt til  
35 brønnene fulgt av et vasketrinn og tilsetningen av streptavidin pepperrotperoksidase (SA-HRP; RnD Systems, katalog # DY998) for deteksjon av den fangede PEG-FGF-21. Etter et annet vasketrinn, blir tetrametylbenzidin (TMB, Kirkegaard Perry Laboratories) substratløsning tilsatt til brønnene. TMB reagerer med peroksidet i nærvær av HRP og gir et kolorimetrisk signal proporsjonalt med mengden av PEG-FGF-21 analogt bundet ved

innfangningsreagensen i det innledende trinnet. Fargeutviklingen blir stoppet ved tilsetningen av 2N svovelsyre og intensiteten av fargen (optisk tetthet, OD) blir målt ved 450 nm. Omformingen av OD enheter for studieprøvene og QCene til konsentrasjon blir oppnådd ved en datamaskin-programvare mediert sammenligning med en standardkurve på den samme platen, som blir regredert ifølge en 5-parameter logistisk regresjonsmodell ved anvendelse av SOFTmax Pro v5 datareduksjonspakke. Resultater er rapportert i ng/ml konsentrasjonsenheter.

Konsentrasjoner kan også bli målt ved en dobbel antistoff tosidig analyse eller andre fremgangsmåter kjent for fagpersonene. Konsentrasjoner ble beregnet ved anvendelse av en standardkurve generert fra den tilsvarende doserte forbindelsen. Farmakokinetiske parametere ble estimert ved anvendelse av modelleringsprogrammet WinNonlin (Pharsight, versjon 4.1). Ikke-kompartmental analyse for individuelle dyredata med lineær-opp/log-ned trapesoidal integrering ble brukt, og konsentrasjonsdata ble enhetlig vektet.

*Konklusjoner:* De farmakokinetiske egenskapene av WT N6-His FGF21 var på linje med det rapportert ved Kharitonov et al, 2005 og var sammenlignbare med det ikke-taggede WT FGF21 proteinet.

De farmakokinetiske profilene av 30KPEG-pAF(N6-His)FGF21 isomerene ble signifikant øket ved addisjonen av et 30 kDa PEG molekyl sammenlignet med resultatene oppnådd fra WT (u-PEGylert) FGF21.

De PEGylerte forbindelsene utviste markert forskjellige PK profiler når dosert ved 0,25 mg/kg nivået subkutant. H87 og L86 hadde en tendens til å ha underlegne PK kjennetegn sammenlignet med de andre isomerene. Videre ville R131 og Q108 PEG30 forbindelser differensielt generere overlegne PK egenskaper. Mer spesifikt hadde disse forbindelse forbedret AUC, Cmaks og terminal halveringstid. En dyptgående struktur-aktivitet analyse kan avsløre strukturelle forklaringer for de ulike PK egenskapene for hver isomer.

Sammenligning av PEG molekylvekt viste at 30KPEG-pAF91(N6-His)FGF21 har en svakt større bestandighet i sirkuleringen enn 20KPEG-pAF91(N6-His)FGF21. Imidlertid siden 20 kDa isomerer hadde en høyere Cmaks-verdi, var den totale AUCinf for de to forbindelsene sammenlignbar. Biologisk tilgjengelighet for 20 kDa isoformen var noe bedre enn 30 kDa varianten ved henholdsvis 30 % versus 20 %.

Tabell 3. Farmakokinetiske parameterverdier for forbindelser dosert 0,25 mg/kg subkutant i rotte.

0,25 mg/kg SC	Terminal $t_{1/2}$	Tmaks	Cmaks	AUC <sub>alle</sub>	AUC <sub>INF</sub>	Vz/f	Cl/f	MRT <sub>INF</sub>
	hr	hr	ng/ml	hr*ng/ml	hr*ng/ml	ml/kg	ml/hr /kg	hr
N6His WT	1,26	0,9	92,1	261,6	297,3	1768,9	971,2	2,52
PP WT	1,19	1,5	96,6	259,8	294,7	1576,2	910,4	2,53
R72	14,72	24	254,5	NE	11824,7	458,9	21,9	36,52
R77	32,30	22	237,0	144571,9	17687,8	655,8	14,4	59,18
L86	33,90	27	52,2	3215,7	3928,8	3153,3	66,0	59,27
H87	16,14	24	174,3	NE	8206,7	731,1	31,7	36,31
E91	19,93	22	229,7	NE	12177,2	606,2	20,9	40,35
Y104	12,37	24	321,9	19085,8	21188,1	416,3	11,9	47,63
Q108	27,31	24	590,3	31837,4	36387,1	272,4	7,0	51,71
R126	16,48	20	248,1	13238,3	15033,4	643,0	16,8	49,57
R131	26,13	24	545,4	27373,4	30786,0	315,0	8,3	50,41
P146	22,01	24	321,3	NE	15908,4	503,4	15,9	40,07

Serumkonsentrasjon versus tid kurver ble evaluert ved ikke-kompartmental analyse (Pharsight, versjon 4.1). N=3-4 rotter per forbindelse. ND: ikke gjort; NE: ikke evaluert. Tmaks: tid for å nå Cmaks; Cmaks: maksimal konsentrasjon; terminal  $t_{1/2}$ : terminal halveringstid; AUC<sub>last</sub>: areal under konsentrasjon-tid kurven til den siste plasmaprøven/-tidspunkt; AUC<sub>inf</sub>: areal under konsentrasjon-tid kurven ekstrapolert til uendelighet; MRT: midlere oppholdstid; Cl/f: tilsynelatende total plasmaclearance; Vz/f: tilsynelatende fordelingsvolum i løpet av terminal fase.

10 Tabell 4. Farmakokinetiske parameterverdier for 20KPEG-pAF91(16-hHis)FGF21 dosert 0,25 mg/kg subkutant i rotte.

		Rotte #1	Rotte #2	Rotte #3	Rotte #4
Terminal $t_{1/2}$	hr	22,6	24,4	17,3	16,9
Tmaks	hr	8	8	8	24
Cmaks	ng/ml	163,0	182,1	155,7	88,8
AUC <sub>all</sub>	hr*ng/ml	7629,1	7659,1	6461,4	4375,4

		Rotte #1	Rotte #2	Rotte #3	Rotte #4
AUC <sub>INF</sub>	hr*ng/ml	8232,0	8333,8	6661,2	4521,7
V <sub>Z</sub> /f	ml/kg	989,8	1054,2	937,3	1347,7
Cl/f	ml/hr/kg	30,4	30,0	37,5	55,3
MRT <sub>INF</sub>	hr	39,9	41,0	32,5	34,3

Konsentrasjon versus tid kurver ble evaluert ved ikke-kompartmental analyse (Pharsight, versjon 4.1). ND: ikke gjort; NE: kunne ikke bli evaluert. Tmaks: tid for å nå Cmaks; Cmaks: maksimal konsentrasjon; terminal t<sub>1/2</sub>: terminal halveringstid; AUC<sub>last</sub>: areal under konsentrasjon-tid kurven til den siste plasmaprøven/tidspunktet; AUC<sub>inf</sub>: areal under konsentrasjon-tid kurven ekstrapolert til uendelighet; MRT: midlere oppholdstid; Cl/f: tilsynelatende total plasmaclearance; V<sub>Z</sub>/f: tilsynelatende fordelingsvolum i løpet av terminal fase.

#### 10 Eksempel 31

Humant klinisk forsøk for sikkerheten og/eller virksomheten av PEGylert FGF-21 omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre.

15 Formål Å observere sikkerheten og farmakokinetikken av subkutant administrert PEGylert rekombinant human FGF-21 omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre.

Pasienter Atten friske frivillige som spenner mellom 20-40 års alder og veier mellom 60-90 kg er opptatt i studien. Subjektene vil ikke ha noen klinisk signifikante unormale laboratorieverdier for hematologi eller serumkjemi, og en negativ urin toksikologiscreen, HIV-screen og hepatitt B overflate-antigen. De skulle ikke ha noen tegn på de følgende: hypertensjon; en historie med noen primær hematologisk sykdom; historie av signifikant hepatisk, renal, kardiovaskulær, gastrointestinal, urogenital, metabolsk, nevrologisk sykdom; en historie med anemi eller anfallsforstyrrelse; en kjent sensitivitet til bakterielle eller mammalsk-avledede produkter, PEG eller humant serumalbumin; vanebundet og tung forbruker av drikkevarer inneholdende koffein; deltagelse i noe annet klinisk forsøk eller fått blod overført eller donert innen 30 dager før inntreden i studien; hatt eksponering for FGF-21 innen tre måneder før inntreden i studien; hatt en sykdom innen syv dager før inntreden i studie; og ha signifikante abnormaliteter ved den pre-studie fysiske granskningen eller de kliniske laboratorie-evalueringene innen 14 dager før inntreden i studien. All subjekter kan vurderes for sikkerhet og alle blodprøvetakninger for farmakokinetisk analyse blir tatt som forutsatt. Alle studier blir utført med godkjennelse fra instituttets etiske komité og pasientsamtykke.

Studiedesign Dette vil være en fase I, enkelt-senter, åpent-merke, randomisert, to-periode overkrysningsstudie i friske mannlige frivillige. Atten subjekter blir tilfeldig tilordnet til én av to behandlingssekvensgrupper (ni subjekter/gruppe). FGF-21 blir administrert over to separate doseringsperioder så som en bolus s.c. injeksjon i det øvre låret ved anvendelse av ekvivalente doser av den PEGylerte FGF-21 omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre og det valgte kommersielt tilgjengelige produktet. Dosen og frekvensen for administrasjon av det kommersielt tilgjengelige produktet er som instruert på pakningsetiketten. Ytterligere dosering, doseringsfrekvens eller annen parameter ettersom ønsket, ved anvendelse av de kommersielt tilgjengelige produktene kan bli lagt til studien ved å inkludere ytterligere grupper av subjekter. Hver doseringsperiode er atskilt av en 14-dag utvaskingsperiode. Subjekter blir holdt ved studiesenteret minst 12 timer før og 72 timer etter dosering for hver av de to doseringsperiodene, men ikke mellom doseringsperioder. Ytterligere grupper av subjekter kan bli lagt til hvis det skal være ytterligere dosering, frekvens eller annen parameter, som også skal bli testet for den PEGylerte FGF-21. Den eksperimentelle formuleringen av FGF-21 er den PEGylerte FGF-21 omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre.

Blodprøvetakning Serielt blod blir tappet ved direkte venepunksjon før og etter administrasjon av FGF-21. Venøse blodprøver (5 ml) for bestemmelse av serum FGF-21 konsentrasjoner blir oppnådd ved omkring 30, 20 og 10 minutter før dosering (3 grunnlinjeprøver) og ved omtrent de følgende tider etter dosering: 30 minutter og ved 1, 2, 5, 8, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48, 60 og 72 timer. Hver serumprøve blir delt i to alikvoter. Alle serumprøver blir lagret ved -20 °C. Serumprøver blir sendt på tørris. Fastende kliniske laboratorietester (hematologi, serum kjemi og urinprøve) blir utført umiddelbart før den innledende dosen på dag 1, morgenen på dag 4, umiddelbart før dosering på dag 16 og morgenen på dag 19.

Bioanalytiske metoder Et ELISA kit blir brukt for bestemmelsen av serum FGF-21 konsentrasjoner.

Sikkerhetsbestemmelse Vitale tegn blir registrert umiddelbart før hver dosering (dagene 1 og 16) og ved 6, 24, 48 og 72 timer etter hver dosering. Sikkerhetsbestemmelser er basert på forekomsten og typen av ugunstige hendelser og forandringene i kliniske laboratorietester fra grunnlinje. I tillegg blir forandringer fra pre-studie i målinger av vitale tegn, inkludert blodtrykk og fysiske granskningsresultater evaluert.

Dataanalyse Etter-dose serumkonsentrasjonverdier blir korrigert for pre-dose grunnlinje FGF-21 konsentrasjoner ved å subtrahere fra hver av post-dose verdiene den

midlere grunnlinje FGF-21 konsentrasjonen bestemt fra å beregne gjennomsnitt av FGF-21 nivåene fra de tre prøvene samlet ved 30, 20 og 10 minutter før dosering. Pre-dose serum FGF-21 konsentrasjoner er ikke inkludert i beregningen av den midlere verdien hvis de er under kvantifiseringsnivået for analysen. Farmakokinetiske parametere blir bestemt fra serumkonsentrasjonsdata korrigert for grunnlinje FGF-21 konsentrasjoner. Farmakokinetiske parametere blir beregnet ved modelluavhengige metoder på et Digital Equipment Corporation VAX 8600 datamaskinsystem ved anvendelse av den siste versjonen av BIOAVL programvaren. De følgende farmakokinetikkparametere blir bestemt: topp serumkonsentrasjon ( $C_{maks}$ ); tid til topp serumkonsentrasjon ( $t_{maks}$ ); areal under konsentrasjon-tid kurven (AUC) fra tid null til den siste blodprøvetakningstiden ( $AUC_{0-72}$ ) beregnet med anvendelsen av den lineære trapesformelen; og terminal elimineringshalveringstid ( $t_{1/2}$ ), beregnet fra elimineringshastighetskonstanten. Elimineringshastighetskonstanten blir estimert ved lineær regresjon av konsekutive datapunkter i den terminale lineære regionen av det log-lineære konsentrasjon-tid plottet. Middelet, standardavviket (SD) og variasjonskoeffisienten (CV) for de farmakokinetiske parametere blir beregnet for hver behandling. Forholdet av parameter-middelverdiene (konservert formulering/ikke-konservert formulering) blir beregnet.

Sikkerhetsresultater Forekomsten av ugunstige hendelser er likemessig fordelt over behandlingsgruppene. Det er ingen klinisk signifikante forandringer fra grunnlinje eller pre-studie kliniske laborietester eller blodtrykk, og ingen merkbare forandringer fra pre-studie i fysiske granskningsresultater og målinger av vitale tegn. Sikkerhetsprofilene for de to behandlingsgruppene skulle fremstå likedan.

Farmakokinetiske resultater Midlere serum FGF-21 konsentrasjon-tid profiler (ukorrigert for grunnlinje FGF-21 nivåer) i alle 18 subjekter etter å ha mottatt PEGylert FGF-21 omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre ved hvert målte tidspunkt. Alle subjekter skulle ha pre-dose grunnlinje FGF-21 konsentrasjoner innen det normale fysiologiske området. Farmakokinetiske parametere blir bestemt fra serumdata korrigert for pre-dose midlere grunnlinje FGF-21 konsentrasjoner og  $C_{maks}$  og  $t_{maks}$  blir bestemt. Den midlere  $t_{maks}$  for hvilke(n) som helst valgte kliniske komparator(er) er signifikant kortere enn  $t_{maks}$  for den PEGylerte FGF-21 omfattende den ikke-naturlig kodede aminosyren. Terminale halveringstidsverdier er signifikant kortere for de(n) prekliniske komparator(en)e testet sammenlignet med den terminale halveringstiden for den PEGylerte FGF-21 omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre.

Selv om foreliggende studie er gjennomført med friske mannlige subjekter, ville lignende absorpsjonskarakteristikker og sikkerhetsprofiler være forventet i andre pasientpopulasjoner; så som mannlige eller kvinnelige pasienter med kreft eller kronisk

nyresvikt, pediatrike nyresviktpasienter, pasienter i autologe forhåndslagring programmer, eller pasienter satt opp for elektiv kirurgi.

Som konklusjon vil subkutant administrerte enkeltdoser av PEGylert FGF-21 omfattende ikke-naturlig kodet aminosyre være sikkert og godt tolerert av friske mannlige subjekter. Basert på en sammenlignbar forekomst av ugunstige hendelser, kliniske laboratorieverdier, vitale tegn og fysiske granskningsresultater, vil sikkerhetsprofilene for de kommersielt tilgjengelige formene av FGF-21 og PEGylert FGF-21 omfattende ikke-naturlig kodet aminosyre være ekvivalente. Den PEGylerte FGF-21 omfattende ikke-naturlig kodet aminosyre tilveiebringer potensielt stor klinisk nytte for pasienter og helsepersonell.

Det blir forstått at eksemplene og utførelsesformene beskrevet heri bare er for illustrerende formål og at ulike modifikasjoner eller forandringer i lys derav vil bli foreslått av fagpersonene og skal være inkludert innen ånden og rekkevidden av denne søknaden og omfanget av de vedlagte kravene.

TABELL 5: Anførte sekvenser.

SEKV ID #	Sekvensnavn
1	Aminosyresekvens av FGF-21 uten leder (P-form) <b>HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPE</b> <b>SLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDYGALYGLHFDPEACSFRELLLE</b> <b>DGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGI</b> <b>LAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS</b>
2	Aminosyresekvens av FGF-21 uten leder (P-form)-His tagget <b>MHHHHHHSGGHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDG</b> <b>TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDYGALYGLHFD</b> <b>PEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLP</b> <b>GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS</b>
3	Aminosyresekvens av FGF-21 med leder (P-form)-leder med 3 leuciner (209 aminosyre P-form) <b>MDSDETGFESGLWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLY</b> <b>YTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS</b> <b>RFLCQRPDYGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGN</b> <b>KSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQ</b> <b>GRSPSYAS</b>
4	Aminosyresekvens av FGF-21 med leder (P-form)- leder med to leuciner <b>MDSDETGFESGLWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLY</b> <b>TDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSR</b> <b>FLCQRPDYGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNK</b> <b>SPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQ</b> <b>RSPSYAS</b>



5	<p>Aminosyresekvens av FGF-21 uten leder (L form)</p> <p>His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser</p>
6	<p>Aminosyresekvens av FGF-21 med leder (L form) - leder med 3 leuciner (209 aminosyre L-form)</p> <p>Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val</p>
	<p>Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser</p>
7	<p>Aminosyresekvens av FGF-21 med leder (L form) -leder med 2 leuciner (208 aminosyre L-form)</p> <p>Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser</p>
8	<p>Nukleotidsekvens for FGF-21 uten leder (P-form)</p> <p>CACCCATCCCTGACTCCAGTCCTCCTGCAATTCGGGGGCAAGTC  CGGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATGCCAGCAGACAGAAGCCCA  CCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGA  GCCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTC  AAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATG  GGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCC  GGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCC  ACGGCCTCCCCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGAC  CCTGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCTGCCACTACCAGGCCTGCCC  CCCGCACCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGAT  GTGGGCTCCTCGGACCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCAGGGCCGA  AGCCCCAGCTACGCTTCTGA</p>

9	<p>Nukleotidsekvens for FGF-21 uten leder (P-form)-His tagget</p> <p>ATGCATCATCATCATCATAGCGGCGGCCACCCCATCCCTGACTCC  AGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTAC  ACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAGGGAGGA  TGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGC  AGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAG  ACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCG  CTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAG  GACGGATAACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGCTGCAC  CTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGAGGACC  AGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCGGAGCC  ACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCC  TCTGAGCATGGTGGGACCTTCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTC  CTGA</p>
10	<p>Nukleotidsekvens for FGF-21 med leder (P-form)- leder med 3 leuciner</p> <p>ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCT  GTGCTGGCTGGTCTTCTGCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCCATCCCT</p>
	<p>GACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTAC  CTCTACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAG  GGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTC  TCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAG  TCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATG  GATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTC  TTGAGGACGGATAACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGC  TGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGA  GGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCGG  GAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCG  GACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTAC  GCTTCTGA</p>
11	<p>Nukleotidsekvens for FGF-21 med leder (P-form)- leder med 2 leuciner</p> <p>ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCT  GTGCTGGCTGGTCTTCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCCATCCCTGAC  TCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTC  TACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAGGGA  GGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCC  TGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCA  AGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGAT  CGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTG  AGGACGGATAACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGCTGC  ACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGAGGA  CCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCGGAG  CCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGAC  CCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCT  TCCTGA</p>
12	<p>Nukleotidsekvens for FGF-21 uten leder (L form)</p>

	<p>CACCCCATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG  GCCAAGTCCG GCAGCGGTACCTCTACACAG ATGATGCCCA  GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA  GGATGGGACGGTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA  AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCGGGAGTTATC  AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG  GCCAGATGGGGCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT  GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTTGAGGACGGAT  ACAAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCCACGGCC TCCCGCTGCA  CCTGCCAGGGAACAAGTCCC CACACCGGGA CCCTGCACCC  CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCCACTACCAGGCTGCCCC  CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC  CCCCGATGTGGGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CATGGTGGA  CCTTCCAGG GCCGAAGCCCAGCTACGCTTCCTGA</p>
13	<p>Nukleotidsekvens for FGF-21 med leder (L form) - leder med 3 leuciner  ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG  GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG CTG GGA GCC TGC CAG GCA  CAC <u>CCC</u> ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC</p>
	<p>CAA GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG  ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG  GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA  GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA  TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA  TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG  CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC  GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG  GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA  GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC  CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG  GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA</p>
14	<p>Nukleotidsekvens for FGF-21 med leder (L form) - leder med 2 leuciner  ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG  GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC  CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA  GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA  GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC  GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC  TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC  AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG  CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT  CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC  CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG GAC  CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC  CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC  CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG  GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA</p>
34	<p>Aminosyresekvens av FGF-21 (Rattus norvegicus -  ref NP_570108,1 [18543365])</p>

	<p>Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys Leu Leu  Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile Ser Asp Ser Ser Pro  Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp  Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala  His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Thr Leu Tyr  Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys Asp  Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys  Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu  Pro His Glu Pro Gln Glu Gln Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly  Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala  Ser</p>
35	<p>Aminosyresekvens av FGF-21 (Mus musculus - ref[NP_064397.1[[9910218]])  Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg Leu Leu  Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro  Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp</p>
	<p>Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala  His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Ala Leu Tyr  Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp  Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys  Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro  Gly Leu Leu His Glu Pro Gln Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp  Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser  Tyr Ala Ser</p>
36	<p>Aminosyresekvens av FGF-21 (Danio rerio -ref[NP_001038789.1[[113671792]])  Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu Arg Trp Cys  Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly Thr Gln Val Arg Glu  Arg Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Leu Phe Leu Glu Met Asn Pro Asp Gly Ser Val  Lys Gly Ser Pro Glu Lys Asn Leu Asn Cys Val Leu Glu Leu Arg Ser Val Lys Ala  Gly Glu Thr Val Ile Gln Ser Ala Ala Thr Ser Leu Tyr Leu Cys Val Asp Asp Gln  Asp Lys Leu Lys Gly Gln His His Tyr Ser Ala Leu Asp Cys Thr Phe Gln Glu Leu  Leu Leu Asp Gly Tyr Ser Phe Phe Leu Ser Pro His Thr Asn Leu Pro Val Ser Leu  Leu Ser Lys Arg Gln Lys His Gly Asn Pro Leu Ser Arg Phe Leu Pro Val Ser Arg  Ala Glu Asp Ser Arg Thr Gln Glu Val Lys Gln Tyr Ile Gln Asp Ile Asn Leu Asp  Ser Asp Asp Pro Leu Gly Met Gly His Arg Ser His Leu Gln Thr Val Phe Ser Pro  Ser Leu His Thr Lys Lys</p>
37	<p>Aminosyresekvens av Klotho beta (Homo sapiens -  ref[NP_783864.1[[28376633]])</p>

	<p>MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVT  GFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWIGTALQVEGSWK  KDGGKPSIWDHFIHHLKNSSTNGSSDSYIFLEKDLSDDFIGVSFYQFSI  SWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEIVTLYHWDLPLALQE  KYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFQDRVKYWITHNPYLVAWHGYGTG  MHAPGEKGNLAAVYTVGHNLKAHASKVWHNYNTHFRPHQKQWLSITLG  SHWIEPNRSENTMDIFKCCQSMVSVLGFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS  VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNREAL  NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD  EIRVFGYTAWSLLDGFQWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYY  KQIIRENGFSLKESTPDVQGFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL  YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYR  FALDWASVLP TG NLSAVNRQALRYRCV VSEGLKLGISAMVTLYYPTHA  HLGLPEPLLHADGWLN PSTAEAFQA YAGLCFQELGDLV KLWITINEPNRL  SDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGA VSLSLHAD  WAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKH  RRGLSSSALPRLTEAERLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRVSD  RDIQLQDITRLSSPTRLA VIPWGVRLKLLR WVR RN YGDMDIYTTASGIDDQ  ALEDDRLRKY YLGKYLQEV LKAYLIDKVR IKGY YAFKLAEEKSKPRFGFF  TSDFKAKSSIQFY NKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPL  IFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS</p>
38	Aminosyresekvens av Klotho beta (Mus musculus - refNP_112457.1 GI:13626032)
	<p>MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRTMSNRALQRSVLSAFVLLRA  VTGFSGDGKAIWDDKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWVGVTGAFQVEG  SWKTDGRGPSIWDRIYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSF  YQFSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYRALLDSLVLNIEPIVTLYHWDL  PLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAW  HGFGTGMHAPGEKGNLTA VYTVGHNLKAHASKVWHNYDKNFRPHQK  WLSITLGS HWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSV LGFANPIHGDGDYPEF  MKTGAMIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLN  LRQVLN WIKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQ  AIKFDEIRVFGYTA WTL LDGFQWQDAYTTRRGFLFYVDFNSEQKERKPKSS  AHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFT  DPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKV  THYQFALDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCV VSEGLKLG VFP MVTLYH  PTHSHLGLPLPLSSGGWLN MNTAKAFQDYAELCFRELGDLV KLWITINE  PNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHL YDRQYRPVQHGA VSL  LHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYI  ASKNQRLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVD FYALNHFTTRFVIHKQLNTR  SVADR DVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVRLKLLA WIRRN YRDRDIYITAN  GIDDLALEDQIRKY YLEKYVQEALKA YLIDKVKIKGY YAFKLTEEKSKP  RFGFFTSDFRAKSSVQFY SKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDC TICSFLV  EKKPLIFFGCCFISTLA VLLSITVFHHQKRKFWKARNLQ  NIPLKKGHSRVFS</p>
39	OmpA nukleotid ledersekvens atgaaaaaaactgctatcgcatcgctgtagctctggctggttcgcgaccgtagctaacgct
40	OmpA aminosyre ledersekvens M K K T A I A I A V A L A G F A T V A N A
41	MalE nukleotid ledersekvens atgaaaataaaaacaggtgcacgcacatcctcgattatccgcattaacgacgatgatgtttccgcctcgctcgcgc

42	MalE aminosyre ledersekvens M K I K T G A R I L A L S A L T T M M F S A S A L A
43	StII nukleotid ledersekvens atgaaaagaatatatcgatttcttcttgcattctatggttcgttttctattgctacaaatgcctatgca
44	StII aminosyre ledersekvens M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A

## SEKVENSLISTE

<110> Cujec, Thomas P.  
Mariani, Roberto  
Hays Putnam, Anna-Maria A.  
5 Keefe, William M.  
Knudsen, Nick  
Ho, Lillian  
Pinkstaff, Jason  
Kraynov, Vadim  
10 <120> Modifiserte FGF-21 polypeptider og deres anvendelser  
<130> P052772EP  
<150> 60/921,297  
<151> 2007-03-30  
<150> 60/988,060  
15 <151> 2007-11-14  
<160> 44  
<170> PatentIn versjon 3,4  
<210> 1  
<211> 181  
20 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 1

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

<210> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2



Met His His His His His His Ser Gly Gly His Pro Ile Pro Asp Ser  
 1 5 10 15

Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr  
 20 25 30

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

Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln  
 50 55 60

Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr  
 65 70 75 80

Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu  
 85 90 95

His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp  
 100 105 110

Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu  
 115 120 125

Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala  
 130 135 140

Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro  
 145 150 155 160

Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu  
 165 170 175

Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180 185 190

<210> 3

<211> 209

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 4

<211> 208

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 181

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 6

10 <211> 209

<212> PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 208

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 546

&lt;212&gt; DNA

5

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

caccccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag 60

ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gccacactgg agatcagggg ggatgggacg 120

gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg 180

ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg 240

gcctgtatg gatcgctcca ctttgacctt gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt 300

gaggacggat acaatgttta ccagtcgaa gccacagccc tcccgtgca cctgccaggg 360

aacaagtccc cacaccggga cctgcacccc cgaggaccag ctcgcttctt gccactacca 420

ggcctgcccc ccgcaccccc ggagccacccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg 480

ggctcctcgg acctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct 540

tcctga 546

&lt;210&gt; 9

10

&lt;211&gt; 576

&lt;212&gt; DNA

## &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

atgcateatc atcatcatca tagcggcggc caccocatcc ctgactccag tcctctcctg 60  
 caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag ctctacacag atgatgccc gcagacagaa 120  
 gccacactcg agatcaggga ggatgggacg gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa 180  
 agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg ggagttatc aaatcttggg agtcaagaca 240  
 tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct 300  
 gaggctgca gcttccggga gctgcttctt gaggacggat acaatgltta ccagtccgaa 360  
 gccacggcc tcccgctgca cctgccaggg aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc 420  
 cgaggaccag ctgccttctt gccactacca ggctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc 480  
 ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg ggctcctcgg accctctgag catggtgagg 540  
 ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct tcttga 576

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 630

&lt;212&gt; DNA

## &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

atggactcgg acgagaccgg gttcagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt 60  
 cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc atccctgact ccagtctctt cctgcaattc 120  
 gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg ccagcagac agaagcccac 180  
 ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaagtctc 240  
 ctgcagctga aagcctttaa gccgggagtt attcaaatct tgggagtaa gacatccagg 300  
 ttctgtgccc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccacttga ccctgaggcc 360  
 tgcagcttcc gggagctgct tcttgggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac 420  
 ggctccccgc tgcacctgcc agggaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga 480  
 ccagctcgtc tctgcccact accaggcctg cccccgcac ccccgagacc acccggaatc 540  
 ctggccccc agcccccca tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggacccttc 600  
 cagggccgaa gccccagcta cgcttcttga 630

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 627

&lt;212&gt; DNA

## &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 11

atggactcgg acgagaccgg gttcagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt 60  
 cttctgggag cctgccaggc acaccccac cctgactcca gtctctctct gcaattcggg 120  
 ggccaagtcc ggcagcggta cctctacaca gatgatgccc agcagacaga agcccacctg 180  
 gagatcaggg aggatgggac ggtggggggc gctgctgacc agagcccoga aagtctcctg 240  
 cagctgaaag ccttgaagcc gggagttatt caaatcttgg gagtcaagac atccaggttc 300

ctgtgccagc ggccagatgg ggcctgtat ggatcgtccc actttgacct tgaggcctgc 360  
 agcttccggg agctgcttct tgaggacgga tacaatgttt accagtcgga agcccacggc 420  
 ctcccgtgc acctgccagg gaacaagtcc ccacaccggg accctgcacc ccgaggacca 480  
 gctcgttcc tgccactacc aggcctgccc cccgcacccc cggagccacc cggaatcctg 540  
 gccccccagc cccccgatgt gggctcctcg gaccctctga gcatggtggg accttcccag 600  
 ggccgaagcc ccagctacgc ttcctga 627

<210> 12

<211> 545

<212> DNA

5 <213> homo sapiens

<400> 12

caccccattc ctgactccag tctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag 60  
 ctctacacag atgatgcca gcagacagaa gcccaoctgg agatcagggg ggatgggacg 120  
 gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg 180  
 ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg 240  
 gccctgtatg gatcgtcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt 300  
 gaggacggat acaatgttta ccagtcgaa gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg 360  
 aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctctcttctt gccactacca 420  
 ggctgcccc ccgcaetccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg 480  
 ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc agctacgctt 540  
 cctga 545

<210> 13

<211> 630

<212> DNA

10 <213> Homo sapiens

<400> 13

atggactcgg acgagaccgg gttcagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt 60  
 cttctgtcgg gagcctgcca ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc 120  
 gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg ccagacagac agaagcccac 180  
 ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaagctctc 240  
 ctgcagctga aagcctttaa gccgggagtt attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg 300  
 ttctgtgcc agcggccaga tggggcctg tatggatcgc tccacttga ccctgaggcc 360  
 tgagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac 420  
 ggctccccgc tgcacctgcc agggaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga 480  
 ccagctcgtc tctgccact accaggcctg cccccgcac tcccgagcc acccggaatc 540  
 ctggccccc agcccccca tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc 600  
 cagggccgaa gccccagcta cgcttctga 630

<210> 14

<211> 627

<212> DNA

15 <213> Homo sapiens

<400> 14

```

atggactcgg acgagaccgg gttcagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt    60
cttctgggag cctgccaggc acaccccatc cctgactcca gtctctctct gcaattcggg    120
ggccaagtcc ggacagcgta cctctacaca gatgatgccc agcagacaga agcccacctg    180
gagatcaggg aggatgggac ggtggggggc gctgctgacc agagcccga aagtctcctg    240
cagctgaaag ccttgaagcc gggagtatt caaatcttg gagtcaagac atccaggttc    300
ctgtgccagc ggcagatgg ggcctgtat ggatcgctcc actttgacc tgaggcctgc    360
agcttcggg agctgcttct tgaggacgga tacaatgttt accagtccga agcccacggc    420
ctcccgtgc acctgccagg gaacaagtcc ccacaccggg accctgcacc ccgaggacca    480
gctcgcttcc tqccactacc aggcctgccc cccgcactcc cggagccacc cggaatcctg    540
gccccccagc cccccgatgt gggctcctcg gaccctctga gcatggtggg accttcccag    600
ggccgaagcc ccagctacgc ttcctga                                         627

```

<210> 15

<211> 77

<212> DNA

5 <213> Kunstig

<220>

<223> Mutant tRNA avledet fra Methanococcus jannaschii tRNA

<400> 15

```

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa    60
tccagccccgc cggacca                                                    77

```

10 <210> 16

<211> 306

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

15 <223> Mutant syntetase avledet fra Methanococcus jannaschii syntetase

<400> 16

```

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1           5           10           15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
20           25           30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35           40           45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50           55           60
Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65           70           75           80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85           90           95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
100          105          110

```



Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His  
145 150 155 160

Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
290 295 300

Arg Leu  
305

<210> 17

<211> 77

<212> DNA

5 <213> Methanococcus jannaschii

<400> 17

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccggcccgc cggacca 77

<210> 18

<211> 88

10 <212> DNA

<213> Kunstig

<220>

<223> En optimalisert ambersupressor tRNA

<400> 18

cccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc 60

15 gagggttcga atcccttccc tgggacca 88

<210> 19

<211> 89

<212> DNA

<213> Kunstig

<220>

5 <223> En optimalisert AGGA rammeskiftsupressor tRNA

<400> 19

gcgagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttctc aatccgttct cgtaggagtt 60

cgagggttcg aatccctccc ctcgcacca 89

<210> 20

<211> 306

10 <212> PRT

<213> Kunstige

<220>

<223> Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-L-fenylalanin

<400> 20

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly  
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys  
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr  
145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
195 200 205

15

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305

<210> 21

<211> 306

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-benzoyl-L-fenylalanin

<400> 21

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His  
145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
290 295 300

Arg Leu  
305

<210> 22

<211> 305

<212> PRT

5 <213> Kunstig

<220>

<223> Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av propargyl-fenylalanin

<400> 22

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala  
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys  
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr  
145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His  
165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn  
180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys  
195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys  
210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile  
225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg  
245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu  
260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn  
275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg  
290 295 300

Leu  
305

<210> 23

<211> 305

<212> PRT

5 <213> Kunstig

<220>

<223> Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av propargyl-fenylalanin

<400> 23

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala



Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala  
 20 25 30  
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45  
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110  
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125  
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140  
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His  
 165 170 175  
 Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn  
 180 185 190  
 Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys  
 195 200 205  
 Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys  
 210 215 220  
 Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg  
 245 250 255  
 Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu  
 260 265 270  
 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn  
 275 280 285  
 Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg  
 290 295 300  
 Leu  
 305

<210> 25

<211> 306

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin

## &lt;400&gt; 25

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His  
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstig



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin

&lt;400&gt; 26

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His  
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305

5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstig

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin

&lt;400&gt; 27

5

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His  
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305

<210> 28

<211> 306

<212> PRT

<213> Kunstig

5

<220>

<223> Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin

<400> 28

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr  
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45  
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110  
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125  
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140  
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His  
 145 150 155 160  
 Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175  
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190  
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255  
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270  
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300  
 Arg Leu  
 305

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstig

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-acetyl-fenylalanin

&lt;400&gt; 29

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu  
 20 25 30  
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45  
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110  
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125  
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140  
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175  
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190  
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255  
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270  
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300  
 Arg Leu  
 305

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstig

&lt;220&gt;

## &lt;223&gt; Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-acetyl-fenylalanin

&lt;400&gt; 30

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu  
 20 25 30  
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45  
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110  
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125  
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140  
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175  
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190  
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255  
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270  
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300  
 Arg Leu  
 305

5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstig

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-acetyl-fenylalanin

&lt;400&gt; 31

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

5 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His  
 145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstig

&lt;220&gt;

5

&lt;223&gt; Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin

&lt;400&gt; 32

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His  
 145 150 155 160

Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305



<210> 33

<211> 306

<212> PRT

<213> Kunstig

5

<220>

<223> Aminoacyl tRNA syntetase for inkorporeringen av p-azido-fenylalanin

<400> 33

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45  
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110  
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125  
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140  
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr  
 145 150 155 160  
 Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175  
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190  
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255  
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270  
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300  
 Arg Leu  
 305

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 208

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 34

Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile  
 20 25 30

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

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

Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser  
 65 70 75 80

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

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

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

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

Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro  
 145 150 155 160

Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln  
 165 170 175

Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro  
 180 185 190

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

<210> 35

<211> 210

<212> PRT

5

<213> Mus musculus

<400> 35

Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile  
 20 25 30

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

Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile



Leu Leu Asp Gly Tyr Ser Phe Phe Leu Ser Pro His Thr Asn Leu Pro  
115 120 125

Val Ser Leu Leu Ser Lys Arg Gln Lys His Gly Asn Pro Leu Ser Arg  
130 135 140

Phe Leu Pro Val Ser Arg Ala Glu Asp Ser Arg Thr Gln Glu Val Lys  
145 150 155 160

Gln Tyr Ile Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Gly Met  
165 170 175

Gly His Arg Ser His Leu Gln Thr Val Phe Ser Pro Ser Leu His Thr  
180 185 190

Lys Lys

<210> 37

<211> 1043

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 37

Met Lys Pro Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe  
1 5 10 15

Phe Ser Thr Asp Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Arg Asn Thr Met Ser Asn  
20 25 30

Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile Leu Leu Arg  
35 40 45

Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn  
50 55 60

Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr  
65 70 75 80

Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val  
85 90 95

Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp His  
100 105 110

Phe Ile His Thr His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser  
115 120 125

Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile  
130 135 140

Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro  
145 150 155 160

Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Tyr Ser  
165 170 175

Thr Leu Leu Asp Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Ile Val Thr Leu  
 180 185 190

Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu Gln Glu Lys Tyr Gly Gly Trp  
 195 200 205

Lys Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys  
 210 215 220

Phe Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His Asn  
 225 230 235 240

Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro  
 245 250 255

Gly Glu Lys Gly Asn Leu Ala Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn Leu  
 260 265 270

Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asn Thr His Phe Arg  
 275 280 285

Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp Ile  
 290 295 300

Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Thr Met Asp Ile Phe Lys Cys Gln Gln  
 305 310 315 320

Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly Asp  
 325 330 335

Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Arg Lys Lys Leu Phe Ser Val Leu Pro  
 340 345 350

Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp Phe  
 355 360 365

Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr Met  
 370 375 380

Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Glu Ala Leu Asn  
 385 390 395 400

Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile Ala Glu Asn  
 405 410 415

Gly Trp Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile  
 420 425 430

Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala Ile Arg Leu  
 435 440 445

Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Leu Asp Gly  
 450 455 460

Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val  
 465 470 475 480

Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His  
 485 490 495

Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser Leu Lys Glu Ser  
 500 505 510

Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val  
 515 520 525

Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe  
 530 535 540

Ser Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Ala Thr Gly Asn Arg Leu Leu  
 545 550 555 560

His Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ala Gln Cys Thr  
 565 570 575

Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met Leu Ala Arg Met Lys  
 580 585 590

Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala Ser Val Leu Pro Thr  
 595 600 605

Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys  
 610 615 620

Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala Met Val Thr Leu  
 625 630 635 640

Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu His  
 645 650 655

Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala Phe Gln Ala Tyr  
 660 665 670

Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile  
 675 680 685

Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Ile Tyr Asn Arg Ser Gly  
 690 695 700

Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala His Asn Leu Leu Val Ala His Ala Leu  
 705 710 715 720

Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala  
 725 730 735

Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr  
 740 745 750

Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile  
 755 760 765

Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala  
 770 775 780

271

Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser  
 785 790 795 800  
 Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr  
 805 810 815  
 Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Met His  
 820 825 830  
 Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe  
 835 840 845  
 Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile  
 850 855 860  
 Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly  
 865 870 875 880  
 Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu  
 885 890 895  
 Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu  
 900 905 910  
 Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr  
 915 920 925  
 Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe  
 930 935 940  
 Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Val  
 945 950 955 960  
 Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg Cys Ser  
 965 970 975  
 Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val Gln  
 980 985 990  
 Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu Val  
 995 1000 1005  
 Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg Lys  
 1010 1015 1020  
 Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys Lys Gly  
 1025 1030 1035  
 Lys Arg Val Val Ser  
 1040

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 1043

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 38



Met Lys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Ser Asp Glu Arg Asn Thr Arg Ser Arg Lys Thr Met Ser Asn  
 20 25 30  
 Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val Leu Leu Arg  
 35 40 45  
 Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp Asp Lys Lys  
 50 55 60  
 Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr  
 65 70 75 80  
 Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala Phe Gln Val  
 85 90 95  
 Glu Gly Ser Trp Lys Thr Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp Arg  
 100 105 110  
 Tyr Val Tyr Ser His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp Arg Ser Thr  
 115 120 125  
 Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Phe Leu  
 130 135 140  
 Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro  
 145 150 155 160  
 Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg  
 165 170 175  
 Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr  
 180 185 190  
 Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly  
 195 200 205  
 Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr  
 210 215 220  
 Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His  
 225 230 235 240  
 Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala  
 245 250 255  
 Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn  
 260 265 270  
 Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asp Lys Asn Phe  
 275 280 285  
 Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp  
 290 295 300

Ile Glu Pro Asn Arg Thr Asp Asn Met Glu Asp Val Ile Asn Cys Gln  
 305 310 315 320

His Ser Met Ser Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly  
 325 330 335

Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Phe Met Lys Thr Gly Ala Met Ile Pro Glu  
 340 345 350

Phe Ser Glu Ala Glu Lys Glu Glu Val Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe  
 355 360 365

Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Arg Pro Ser Asn Thr Val Val  
 370 375 380

Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Gln Val Leu Asn Trp  
 385 390 395 400

Ile Lys Leu Glu Tyr Asp Asp Pro Gln Ile Leu Ile Ser Glu Asn Gly  
 405 410 415

Trp Phe Thr Asp Ser Tyr Ile Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr  
 420 425 430

Met Met Lys Asn Phe Leu Asn Gln Val Leu Gln Ala Ile Lys Phe Asp  
 435 440 445

Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Thr Leu Leu Asp Gly Phe  
 450 455 460

Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp  
 465 470 475 480

Phe Asn Ser Glu Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr  
 485 490 495

Tyr Lys Gln Ile Ile Gln Asp Asn Gly Phe Pro Leu Lys Glu Ser Thr  
 500 505 510

Pro Asp Met Lys Gly Arg Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr  
 515 520 525

Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Phe Thr Val Ser Ser Pro Gln Phe Thr  
 530 535 540

Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Val Thr Gly Asn Arg Leu Leu Tyr  
 545 550 555 560

Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ser Gln Cys Thr Asp  
 565 570 575

Tyr Val Ser Ile Lys Lys Arg Val Glu Met Leu Ala Lys Met Lys Val  
 580 585 590

Thr His Tyr Gln Phe Ala Leu Asp Trp Thr Ser Ile Leu Pro Thr Gly  
 595 600 605

Asn Leu Ser Lys Val Asn Arg Gln Val Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val  
 610 615 620

Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Val Phe Pro Met Val Thr Leu Tyr  
 625 630 635 640

His Pro Thr His Ser His Leu Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Ser Ser  
 645 650 655

Gly Gly Trp Leu Asn Met Asn Thr Ala Lys Ala Phe Gln Asp Tyr Ala  
 660 665 670

Glu Leu Cys Phe Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr  
 675 680 685

Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Met Tyr Asn Arg Thr Ser Asn  
 690 695 700

Asp Thr Tyr Arg Ala Ala His Asn Leu Met Ile Ala His Ala Gln Val  
 705 710 715 720

Trp His Leu Tyr Asp Arg Gln Tyr Arg Pro Val Gln His Gly Ala Val  
 725 730 735

Ser Leu Ser Leu His Cys Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Phe Val  
 740 745 750

Asp Ser His Trp Lys Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala  
 755 760 765

Trp Phe Ala Asp Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ser Val Met  
 770 775 780

Lys Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Asn Gln Arg Gly Leu Ser Ser Ser Val  
 785 790 795 800

Leu Pro Arg Phe Thr Ala Lys Glu Ser Arg Leu Val Lys Gly Thr Val  
 805 810 815

Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Ile His Lys  
 820 825 830

Gln Leu Asn Thr Asn Arg Ser Val Ala Asp Arg Asp Val Gln Phe Leu  
 835 840 845

Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro  
 850 855 860

Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp  
 865 870 875 880

Arg Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Leu Ala Leu Glu  
 885 890 895

Asp Asp Gln Ile Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Val Gln Glu Ala  
 900 905 910

Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala  
 915 920 925

Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr  
 930 935 940

Ser Asp Phe Arg Ala Lys Ser Ser Val Gln Phe Tyr Ser Lys Leu Ile  
 945 950 955 960

Ser Ser Ser Gly Leu Pro Ala Glu Asn Arg Ser Pro Ala Cys Gly Gln  
 965 970 975

Pro Ala Glu Asp Thr Asp Cys Thr Ile Cys Ser Phe Leu Val Glu Lys  
 980 985 990

Lys Pro Leu Ile Phe Phe Gly Cys Cys Phe Ile Ser Thr Leu Ala Val  
 995 1000 1005

Leu Leu Ser Ile Thr Val Phe His His Gln Lys Arg Arg Lys Phe  
 1010 1015 1020

Gln Lys Ala Arg Asn Leu Gln Asn Ile Pro Leu Lys Lys Gly His  
 1025 1030 1035

Ser Arg Val Phe Ser  
 1040

<210> 39

<211> 63

<212> DNA

5 <213> Kunstig

<220>

<223> FGF21 sekresjonskonstrukter, klonet inn i pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 39

atgaaaaaaa ctgctatcgc gatcgctgta gctctggctg gtttcgcgac cgtagctaac 60

gct 63

10 <210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

15 <223> FGF21 sekresjonskonstrukter, klonet inn i pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 40

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
 1 5 10 15

Thr Val Ala Asn Ala  
 20

<210> 41

<211> 78

20 <212> DNA

<213> Kunstig

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FGF21 sekresjonskonstrukter, klonet inn i pVK7ara (Nde/Eco)

&lt;400&gt; 41

atgaaaataa aaacaggtgc acgcatcctc gcattatccg cattaacgac gatgatgttt 60

tcgcctcgg ctctcgcc 78

5 &lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstig

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; FGF21 sekresjonskonstrukter, klonet inn i pVK7ara (Nde/Eco)

&lt;400&gt; 42

Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr  
1 5 10 15Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala  
20 25

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 69

15 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kunstig

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FGF21 sekresjonskonstrukter, klonet inn i pVK7ara (Nde/Eco)

&lt;400&gt; 43

atgaaaaaga atatcgcatc tctctctgca tctatgttcg tttttctat tgctacaaat 60

20 gcctatgca 69

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstig

&lt;220&gt;

25 &lt;223&gt; FGF21 sekresjonskonstrukter, klonet inn i pVK7ara (Nde/Eco)

&lt;400&gt; 44

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser  
1 5 10 15Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala  
20

### P a t e n t k r a v

1. FGF-21 polypeptid omfattende en sekvens vist i SEKV ID NR: 1-7, unntatt at én aminosyre er substituert ved en ikke-naturlig kodet aminosyre ved posisjon 108 (SEKV ID NR: 1 eller de tilsvarende aminosyrene i SEKV IDer NR: 2-7), hvori en vannløselig polymer er knyttet til den ikke-naturlig kodede aminosyren som foreligger i nevnte FGF-21 polypeptid.
2. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori polypeptidet er knyttet til en linker, polymer eller biologisk aktivt molekyl.
3. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori polypeptidet er knyttet til en bifunksjonell polymer, bifunksjonell linker eller minst ett ytterligere FGF-21 polypeptid.
4. FGF-21 polypeptid ifølge krav 3, hvori den bifunksjonelle linkeren eller polymeren er knyttet til et andre polypeptid.
5. FGF-21 polypeptid ifølge krav 4, hvori det andre polypeptidet er et FGF-21 polypeptid.
6. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori den vannløselige polymeren omfatter en poly(etylenglykol)andel.
7. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori den ikke-naturlig kodede aminosyren omfatter en karbonylgruppe, en aminosyregruppe, en hydrazingruppe, en hydrazidgruppe, en semikarbazidgruppe, en azidgruppe eller en alkyngruppe.
8. FGF-21 polypeptid ifølge krav 7, hvori den ikke-naturlig kodede aminosyren omfatter en karbonylgruppe.
9. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori den vannløselige polymeren har en molekylvekt på mellom omkring 0,1 kDa og omkring 100 kDa.
10. FGF-21 polypeptid ifølge krav 9, hvori den vannløselige polymeren har en molekylvekt på mellom omkring 0,1 kDa og omkring 50 kDa.
11. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, som er dannet ved å reagere et FGF-21 polypeptid omfattende en karbonylholdig aminosyre med en vannløselig polymer omfattende en aminosy-, hydrazin-, hydrazid- eller semikarbazidgruppe.

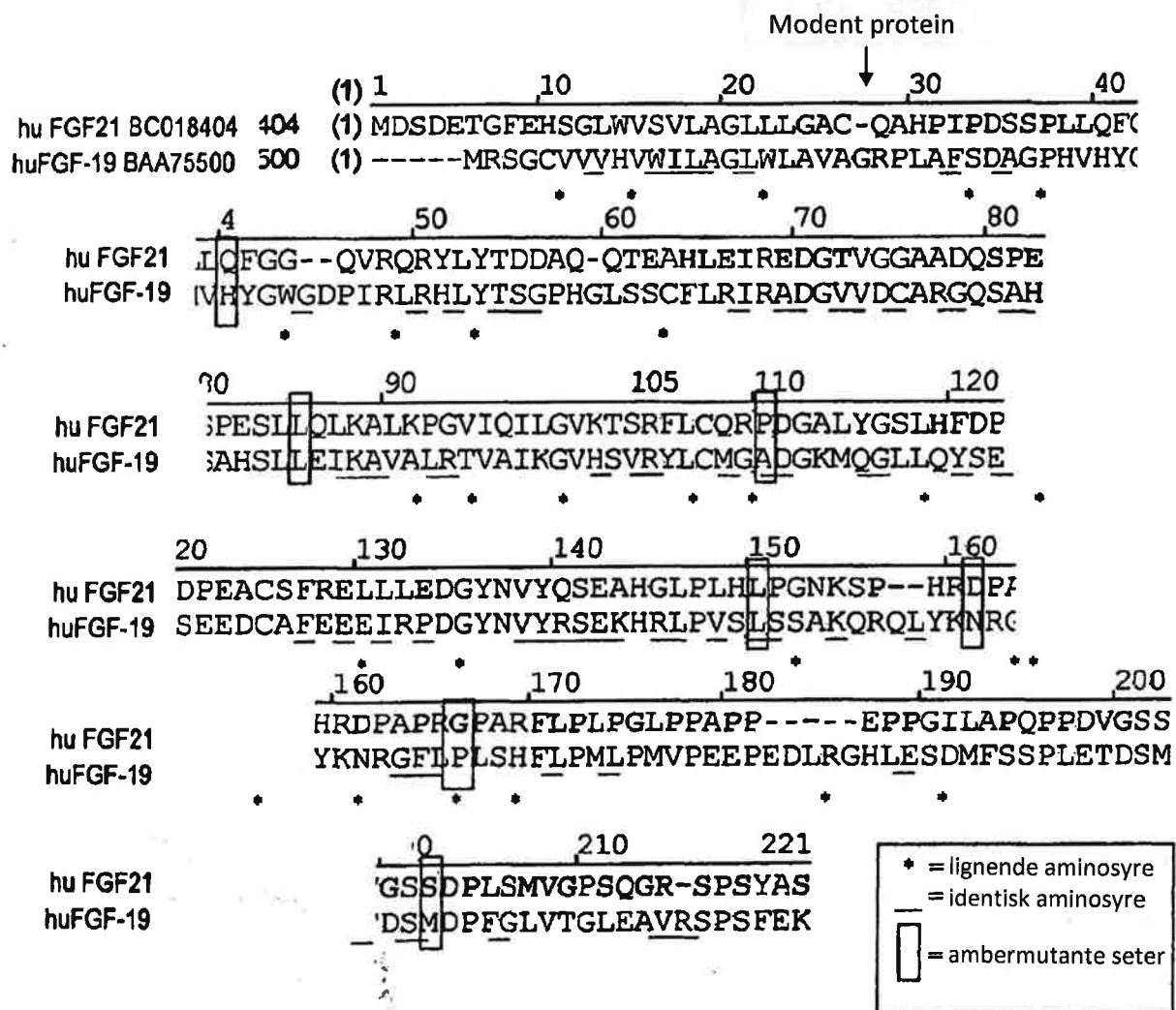
12. FGF-21 polypeptid ifølge krav 11, hvori aminooksy-, hydrazin-, hydrazid- eller semikarbazidgruppen er knyttet til den vannløselige polymeren ved en amidbinding.
13. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, som er dannet ved å reagere en vannløselig polymer omfattende en karbonylgruppe med et polypeptid omfattende en ikke-naturlig kodet aminosyre som omfatter en aminooksy-, en hydrazin-, en hydrazid- eller en semikarbazidgruppe.
14. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori den vannløselige polymeren er en forgrenet eller flerarmet polymer.
15. FGF-21 polypeptid ifølge krav 14, hvori hver forgrening av den vannløselige polymeren har en molekylvekt på mellom omkring 1 kDa og omkring 100 kDa.
16. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori den ikke-naturlig kodede aminosyren omfatter en sakkarid-andel.
17. FGF-21 polypeptid ifølge krav 2, hvori linkerens, polymeren eller det biologisk aktive molekylet er knyttet til polypeptidet via en sakkarid-andel.
18. Sammensetning omfattende FGF-21 polypeptidet ifølge krav 1 og en farmasøytisk akseptabel bærer.
19. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, kodet for ved et polynukleotid som har en sekvens vist i SEKV ID NR: 8, 9, 10, 11, 12, 13 eller 14, hvori nevnte polynukleotid omfatter et selektorkodon.
20. FGF-21 polypeptid ifølge krav 19, hvori den vannløselige polymeren omfatter en poly(etylenglykol)andel.
21. FGF-21 polypeptid ifølge krav 19, hvori den ikke-naturlig kodede aminosyren omfatter en karbonylgruppe, en aminooksygruppe, en hydrazidgruppe, en hydrazingruppe, en semikarbazidgruppe, en azidgruppe eller en alkyngruppe.
22. FGF-21 polypeptid ifølge krav 20, hvori poly(etylenglykol)andelen har en molekylvekt på mellom omkring 0,1 kDa og omkring 100 kDa.
23. FGF-21 polypeptid ifølge krav 20, hvori poly(etylenglykol)andelen er en forgrenet eller flerarmet polymer.

24. Sammensetning ifølge krav 23, hvori poly(etylenglykol)andelen har en molekylvekt på mellom omkring 1 kDa og omkring 100 kDa.
- 5 25. Sammensetning omfattende FGF-21 polypeptidet ifølge krav 19 og en farmasøytisk akseptabel bærer.
26. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, omfattende en vannløselig polymer knyttet ved en kovalent binding til FGF-21 polypeptidet ved den ikke-naturlig forekommende  
10 aminosyren.
27. FGF-21 polypeptid ifølge krav 26, hvori den vannløselige polymeren omfatter en poly(etylenglykol)andel.
- 15 28. FGF-21 polypeptid ifølge krav 7 hvori nevnte ikke-naturlig kodede aminosyre er knyttet til et poly(etylenglykol)molekyl.
29. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, omfattende minst én linker, polymer eller biologisk aktivt molekyl, hvori nevnte linker, polymer eller biologisk aktive molekyl er  
20 festet til polypeptidet gjennom en funksjonell gruppe av den ikke-naturlig kodede aminosyren, som er ribosomalt inkorporert i polypeptidet.
30. FGF-21 polypeptid ifølge krav 29, hvori nevnte FGF-21 polypeptid er monoPEGylert.
- 25 31. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, omfattende en linker, polymer eller biologisk aktivt molekyl som er festet til den ikke-naturlig kodede aminosyren, hvori nevnte ikke-naturlig kodede aminosyre er ribosomalt inkorporert i polypeptidet.
- 30 32. FGF-21 polypeptid ifølge krav 31, hvori FGF-21 polypeptidet omfatter én linker, polymer eller biologisk aktivt molekyl.
33. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori den ikke-naturlig kodede aminosyren omfatter en ketongruppe.
- 35 34. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori nevnte FGF-21 polypeptid omfatter en sekvens som vist i SEKV ID NR: 1 unntatt at én aminosyre er substituert ved en ikke-naturlig kodet aminosyre ved posisjon 108.

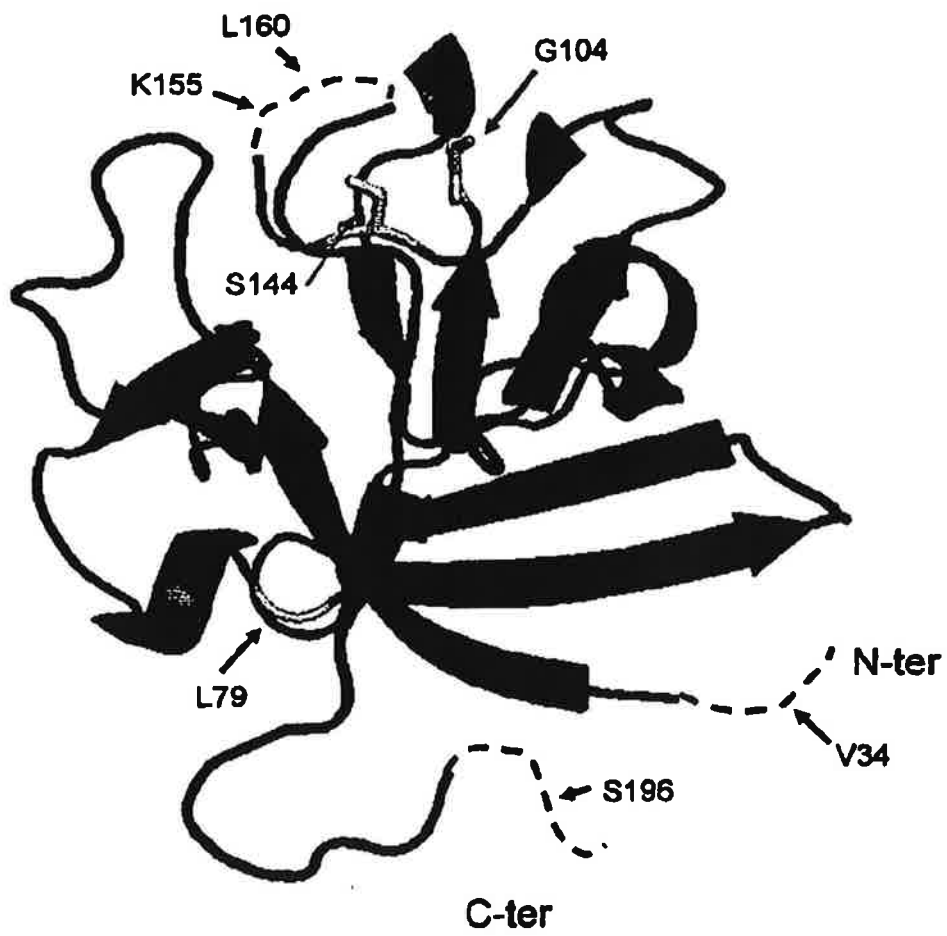


35. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori nevnte ikke-naturlig kodede aminosyre er para-acetyl-fenylalanin.
36. FGF-21 polypeptid ifølge krav 1, hvori nevnte vannløselige polymer er en poly(etylenglykol)andel som har en molekylvekt på 30 kDa.

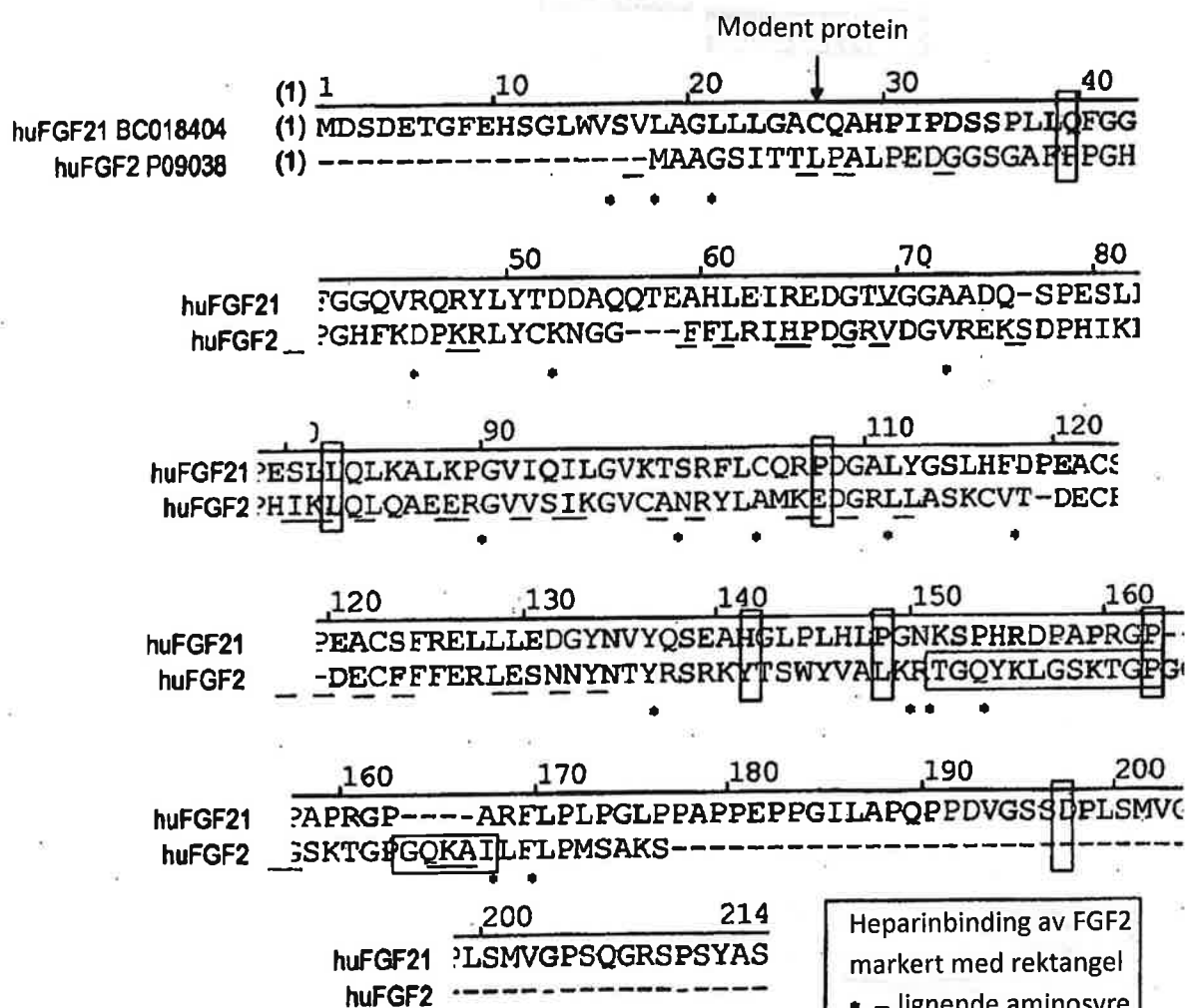
Figur 1



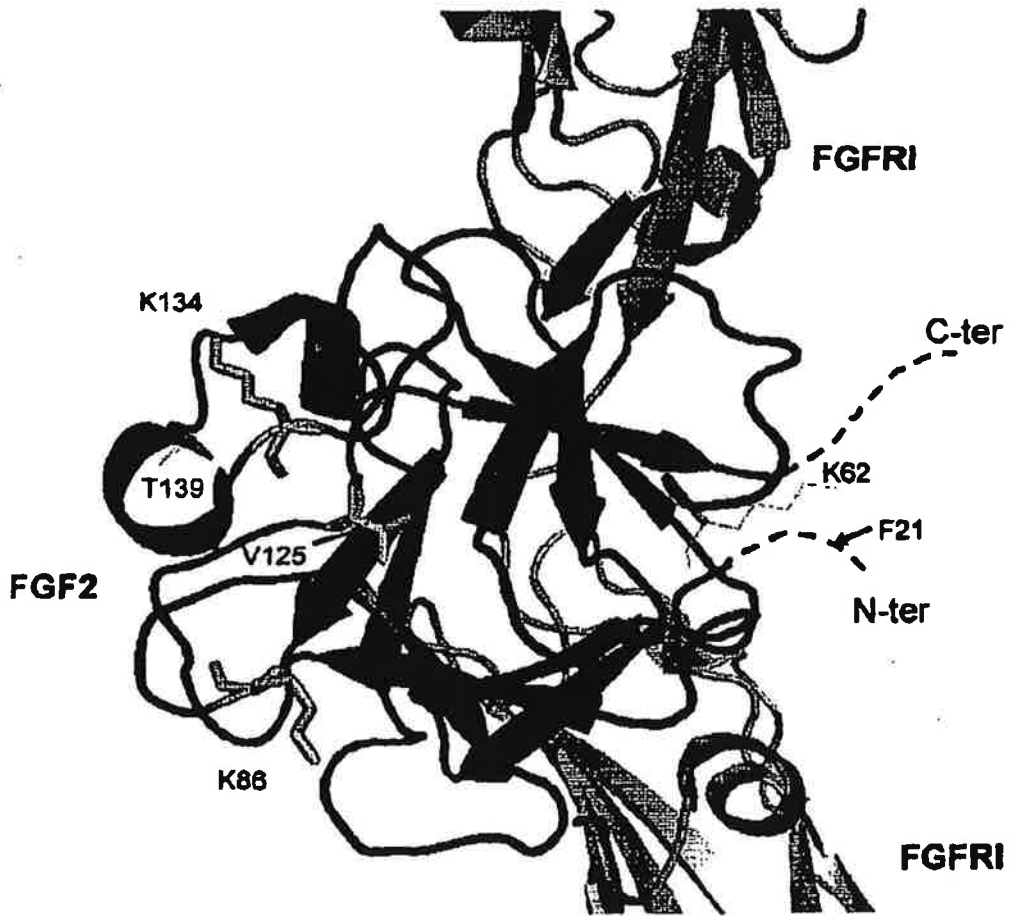
Figur 2

**FGF 19**

Figur 3

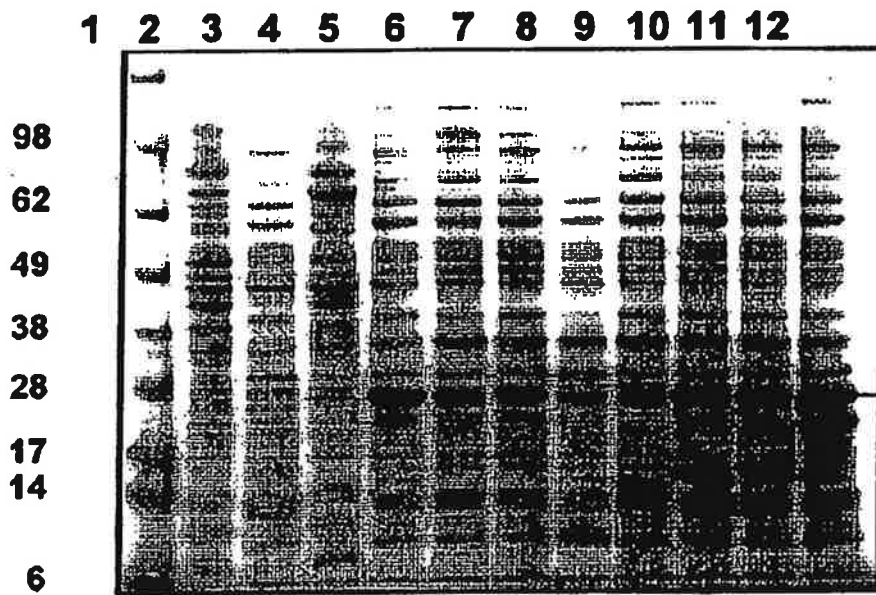


Figur 4

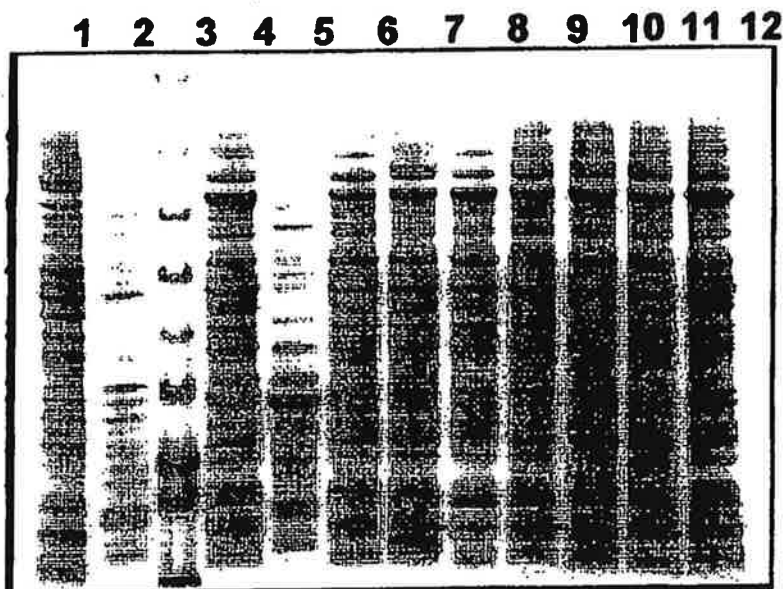


Figur 5

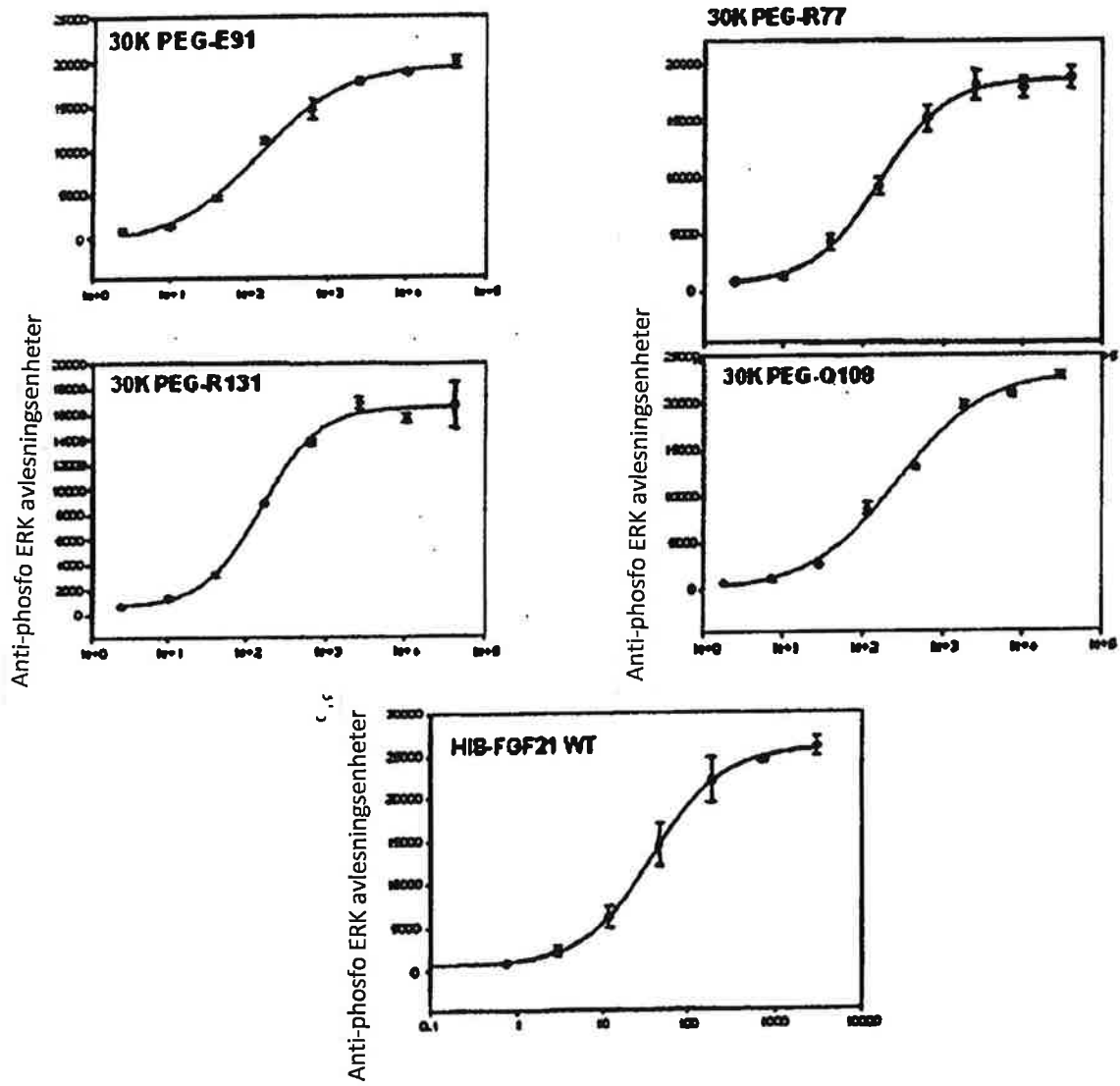
**B-PER Pellet**



Figur 6

**B-PER Supernatant**

Figur 7a

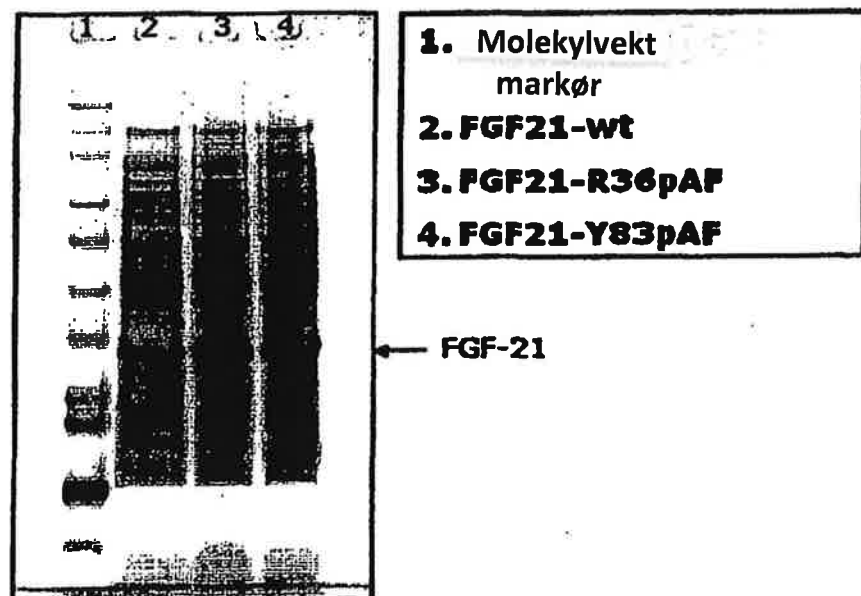




Figur 7b

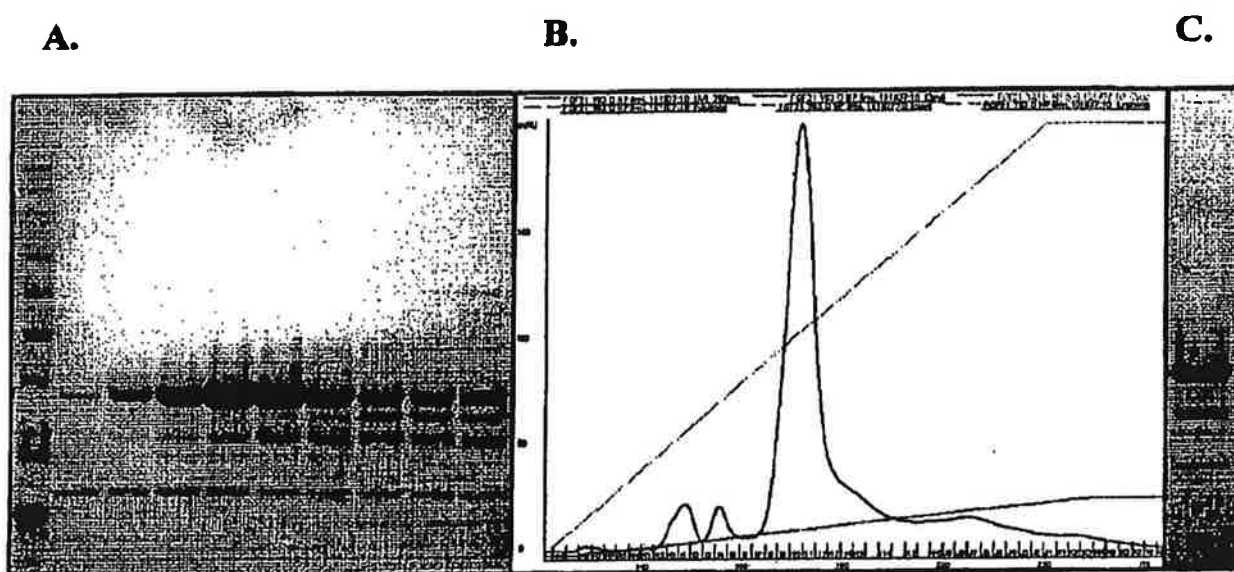
<b>Protein</b>	<b>Ganger tap av aktivitet</b>
<b>HIS-FGF21</b>	<b>1</b>
<b>30KPEG-E91</b>	<b>4</b>
<b>30KPEG R131</b>	<b>4</b>
<b>30KPEG-Q108</b>	<b>6</b>
<b>30KPEG R77</b>	<b>6</b>
<b>30KPEG-R72</b>	<b>14</b>
<b>30KPEG H87</b>	<b>19</b>
<b>30KPEG L86</b>	<b>10</b>
<b>30KPEG R126</b>	<b>11</b>
<b>30KPEG E110</b>	<b>16</b>
<b>30KPEG Y83</b>	<b>17</b>
<b>30KPEG-P146</b>	<b>22</b>
<b>30KPEG R135</b>	<b>26</b>
<b>30KPEG R96</b>	<b>47</b>
<b>30KPEG R36</b>	<b>47</b>
<b>30KPEG Y104</b>	Ingen agonistaktivitet
<b>30KPEG L99</b>	Ingen agonistaktivitet
<b>30KPEG K56</b>	Ingen agonistaktivitet
<b>30KPEG Y22</b>	Ingen agonistaktivitet

Figur 8

Ekspresjon av utagget FGF-21

SDS-PAGE analyse av FGF-21 uttrykt i E. coli

Figur 9

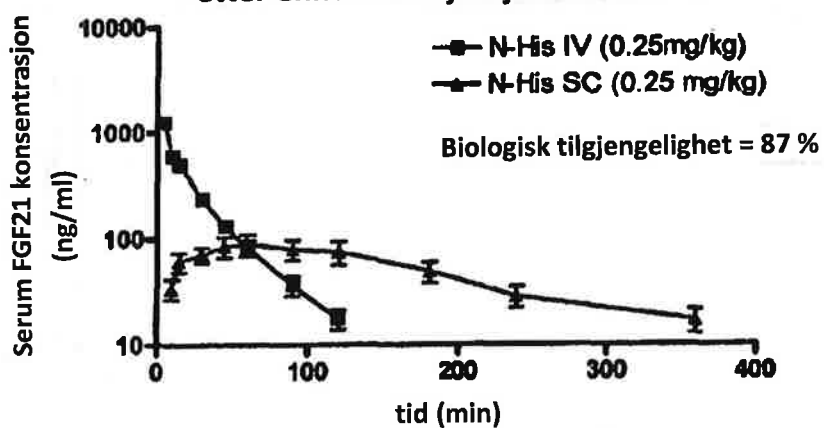
**Rensing: Utagget FGF-21-Y83pAF**

Rensing av utagget FGF-21-Y83pAF. A. Kromatogram av Q HP eluering. B. SDS-PAGE analyse av FGF-21-Y83pAF elueringsfraksjoner. C. SDS-PAGE analyse av FGF-21-Y83pAF Q HP elueringspool

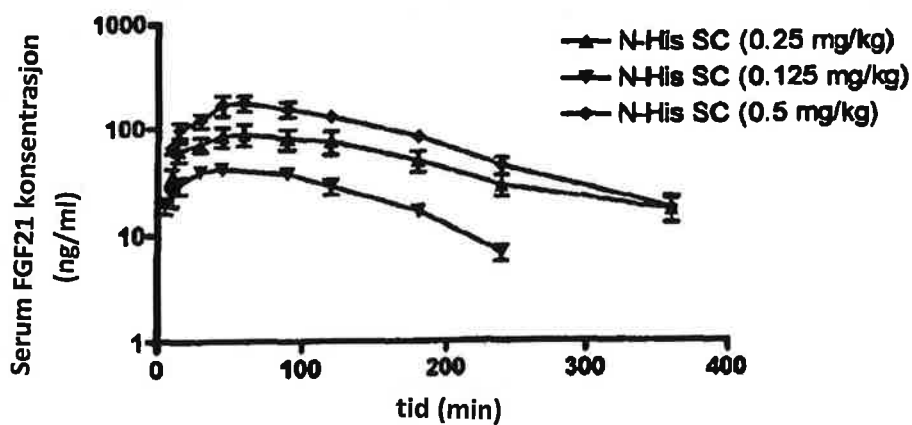
Figur 10

**N-His WT FGF21**

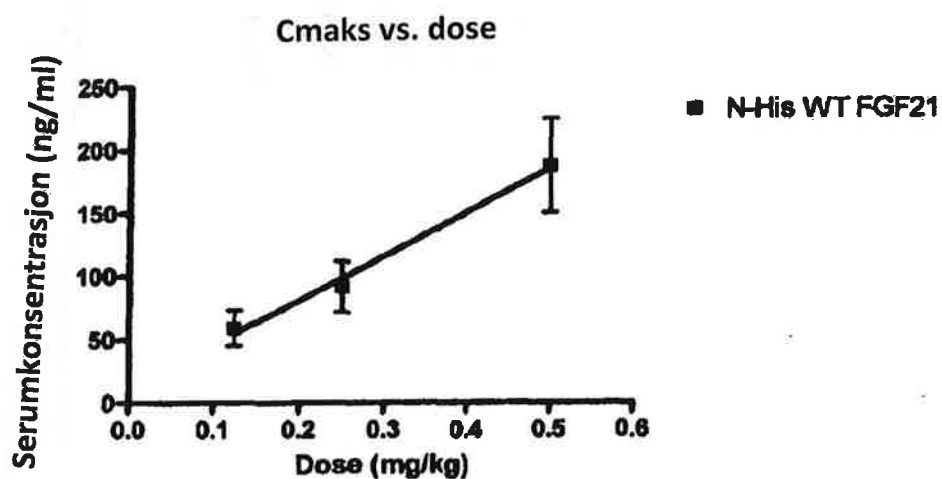
**N-His WT FGF21 serumkonsentrasjon  
etter enkelt SC injeksjon i rotte**



**N-His WT FGF21 serumkonsentrasjon  
etter enkelt SC injeksjon i rotte**



Figur 11

**N-His WT FGF21**

## Beste-tilpasning verdier

Stigning  $348,5 \pm 91,22$ Y-krysning når  $X = 0,0$   $11,55 \pm 30,17$ X-krysning når  $Y = 0,0$   $-0,03315$ 1/stigning  $0,002870$ 

## 95 % konfidensintervaller

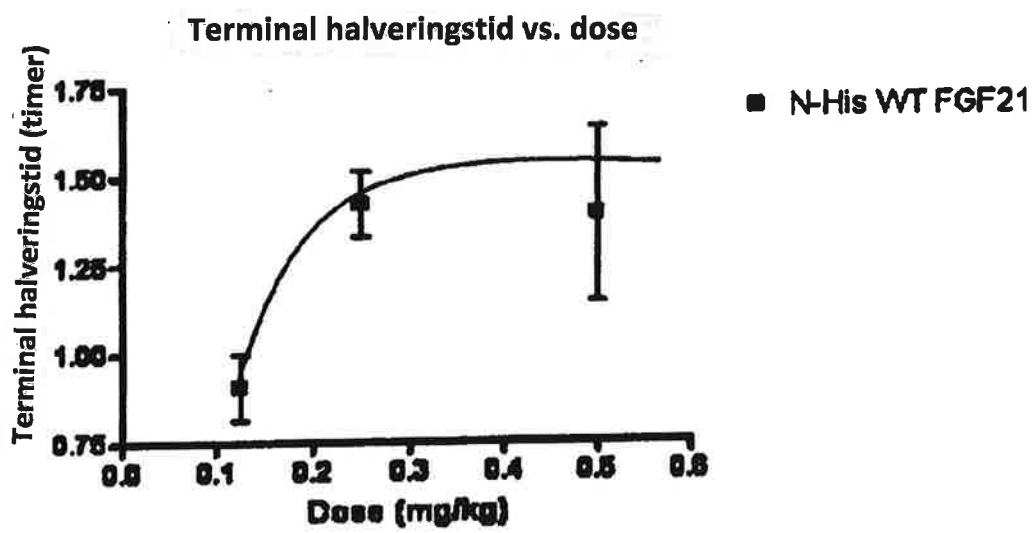
Stigning 145,2 til 551,7

Y-krysning når  $X = 0,0$  -55,67 til 78,77X-krysning når  $Y = 0,0$  -0,5647 til 0,1635

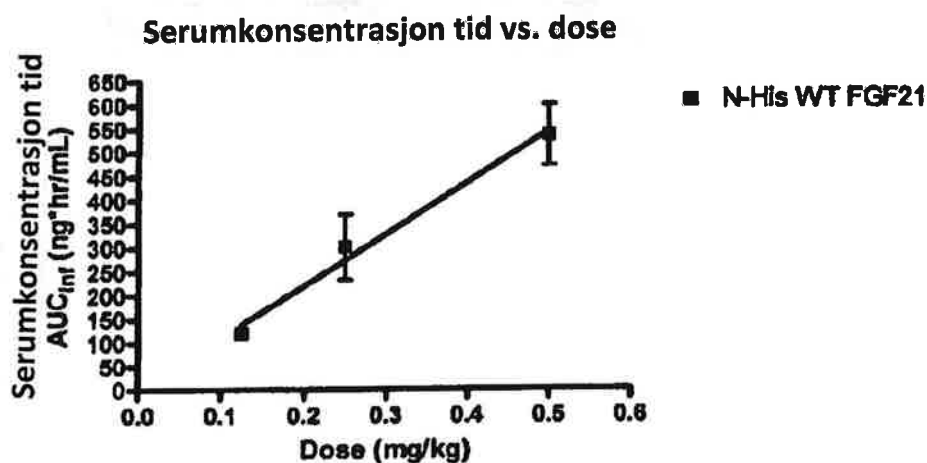
## Kvalitet på tilpasning

 **$r^2$  0.5934****Sy.x 49.27**

Figur 12



Figur 13



### N-His WT FGF21

#### Beste-tilpasning verdier

Stigning  $1079 \pm 194,1$

Y-krysning når  $X = 0,0$   $4,274 \pm 64,19$

X-krysning når  $Y = 0,0$   $-0,03959$

1/stigning  $0,0009265$

#### 95 % konfidensintervaller

Stigning 646,9 til 1512

Y-krysning når  $X = 0,0$   $-138,7$  til  $147,3$

X-krysning når  $Y = 0,0$   $-0,2567$  til  $0,1357$

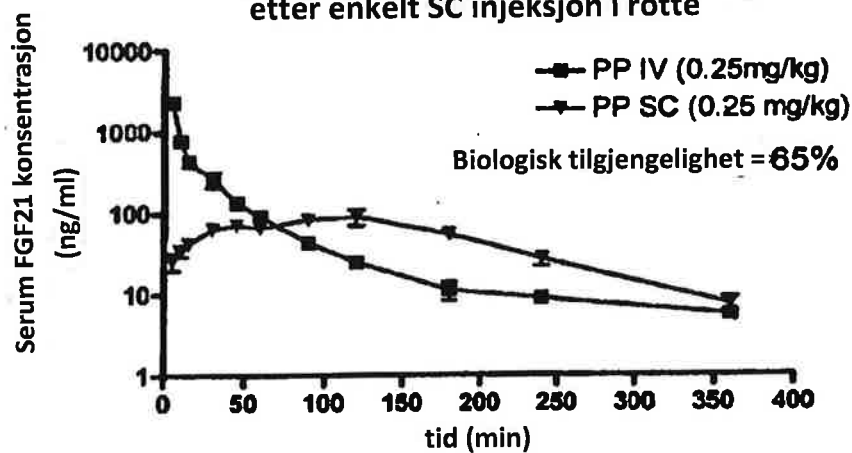
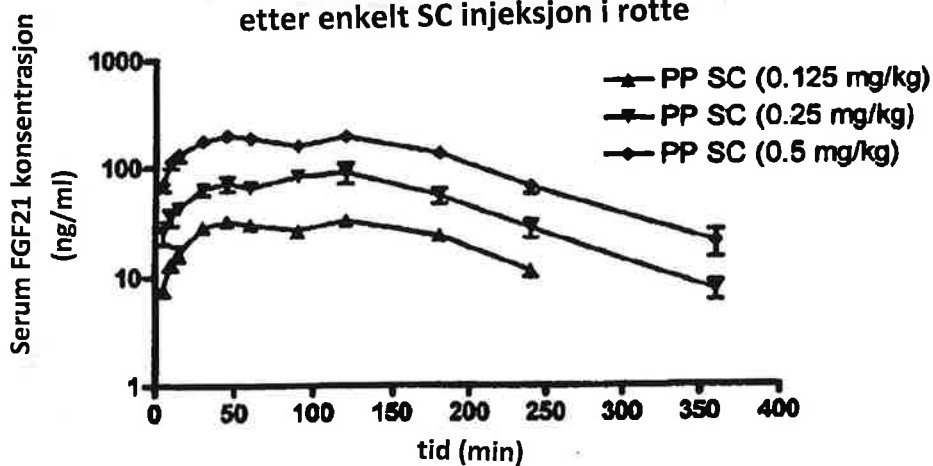
#### Kvalitet på tilpasning

$r^2$  **0.7556**

Sy.x **104.8**

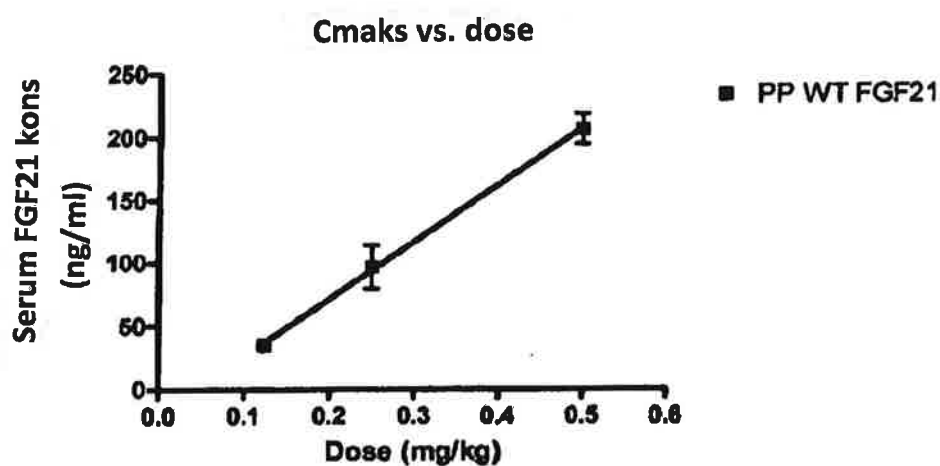
Figur 14

## Periplasmisk avledet WT FGF21

PP WT FGF21 serumkonsentrasjon  
etter enkelt SC injeksjon i rottePP WT FGF21 serumkonsentrasjon  
etter enkelt SC injeksjon i rotte



Figur 15

**PP WT FGF21**

Beste-tilpasning verdier

Stigning  $454,2 \pm 42,42$ Y-krysning når  $X = 0,0$   $-19,66 \pm 14,03$ X-krysning når  $Y = 0,0$   $-0,04329$ 1/stigning  $0,002802$ 

95 % konfidensintervaller

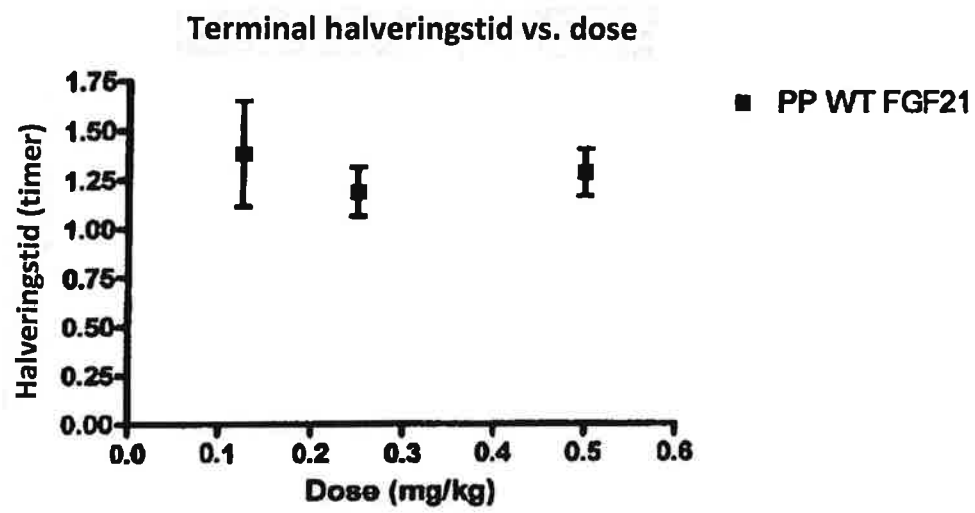
Stigning 359,6 til 548,7

Y-krysning når  $X = 0,0$   $-50,92$  til  $11,60$ X-krysning når  $Y = 0,0$   $-0,05351$  til  $0,1176$ 

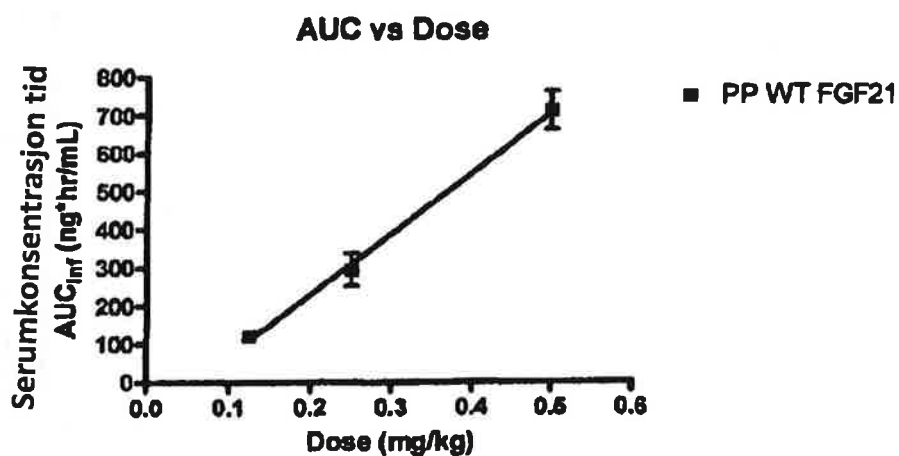
Kvalitet på tilpasning

 $r^2$  **0.9197**Sy.x **22.91**

Figur 16



Figur 17

**PP WT FGF21**

## Beste-tilpasning verdier

Stigning  $1585 \pm 137,1$   
 Y-krysning når  $X = 0,0$   $-86,76 \pm 45,33$   
 X-krysning når  $Y = 0,0$   $0,5474$   
 1/stigning  $0,0006309$

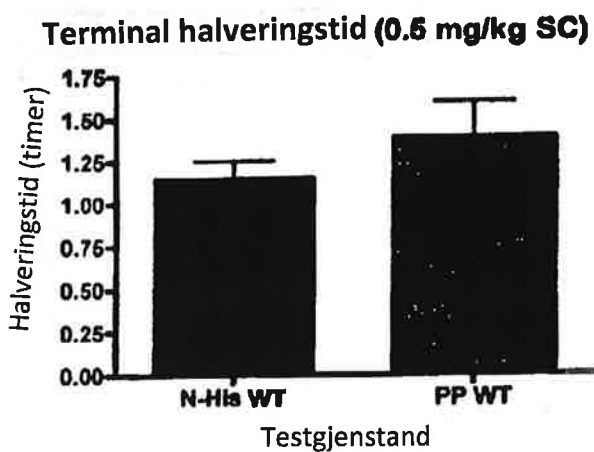
## 95 % konfidensintervaller

Stigning 1280 til 1890  
 Y-krysning når  $X = 0,0$   $-187,8$  til  $14,25$   
 X-krysning når  $Y = 0,0$   $-0,03184$  til  $0,1230$

## Kvalitet på tilpasning

$r^2$  **0.9304**  
 Syx **74.03**

Figur 18

**FGF-R-003****WT hode-til-hode sammenligning**

Parameter Verdi

Tabell analysert HL

Kolonne A N-His WT

vs. vs.

Kolonne B PP WT

Uparet t-test

P-verdi 0,3540

P-verdi oppsummering ns

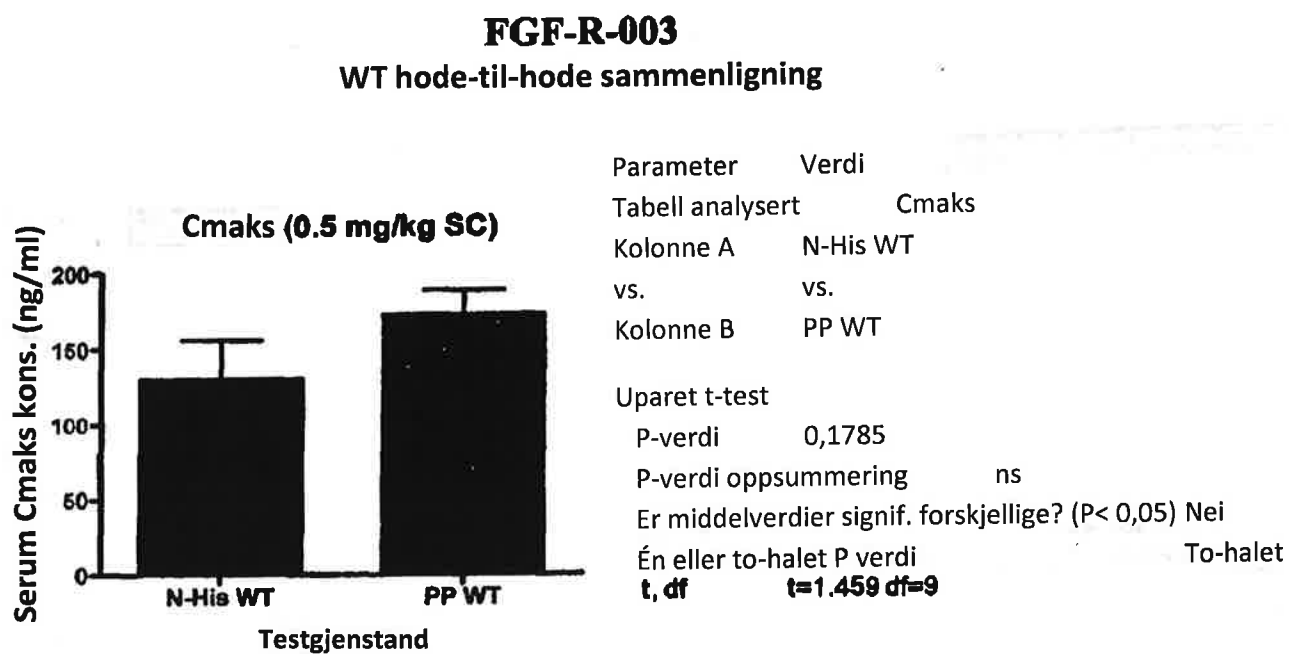
Er middelverdier signif. forskjellige? (P&lt; 0,05) Nei

Én eller to-halet P verdi

To-halet

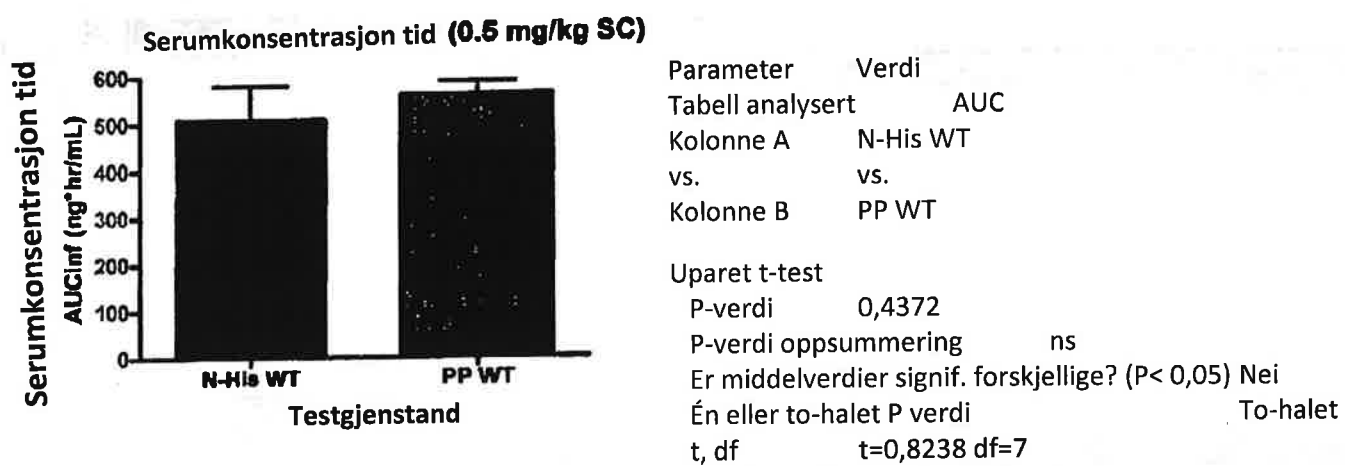
t, df t = 0,9772, df = 9

Figur 19

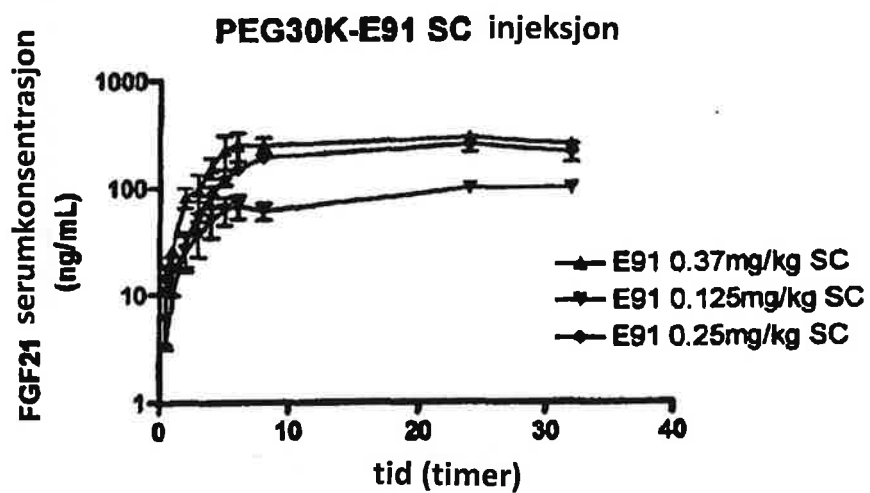
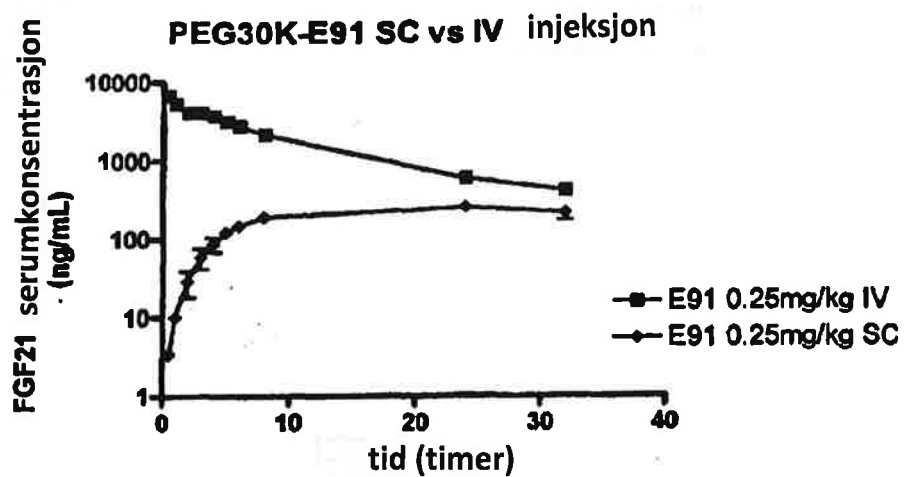


Figur 20

**FGF-R-003**  
WT hode-til-hode sammenligning



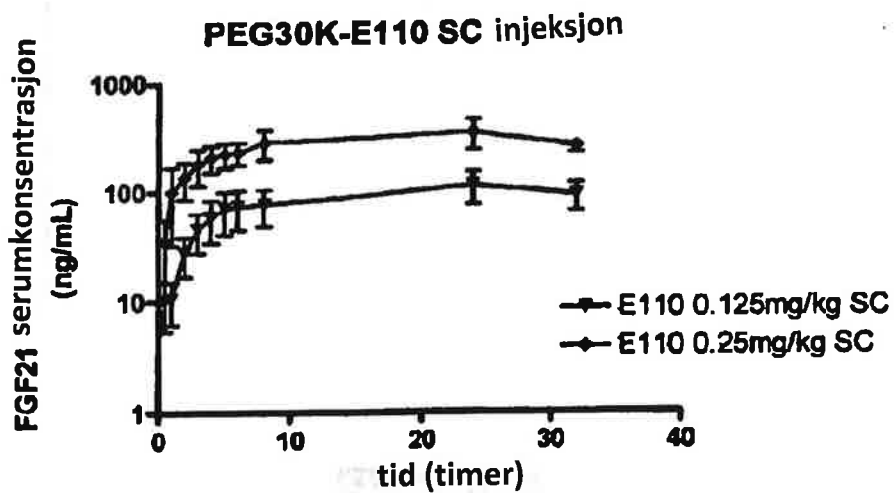
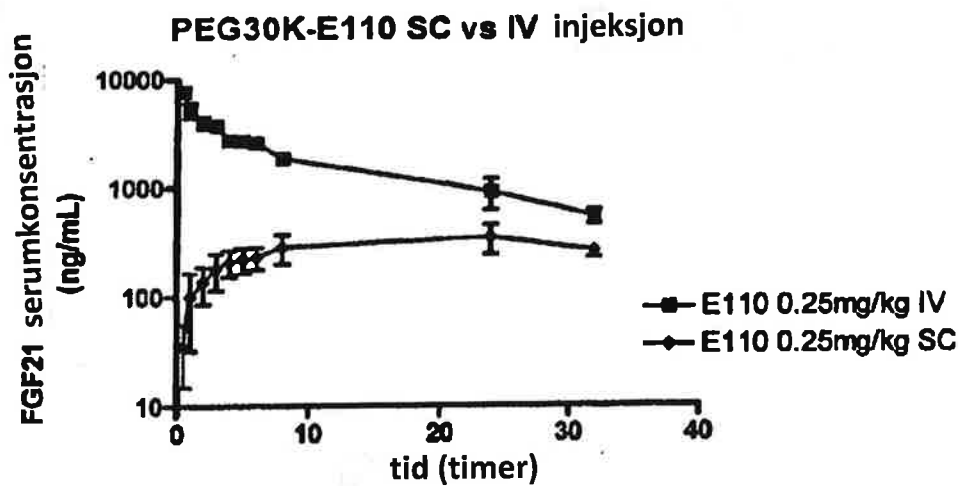
Figur 21

**FGF-R-004 PEG PK del 1**

\* Redusert biotilgjengelighet

Figur 22

## FGF-R-004 PEG PK del 1

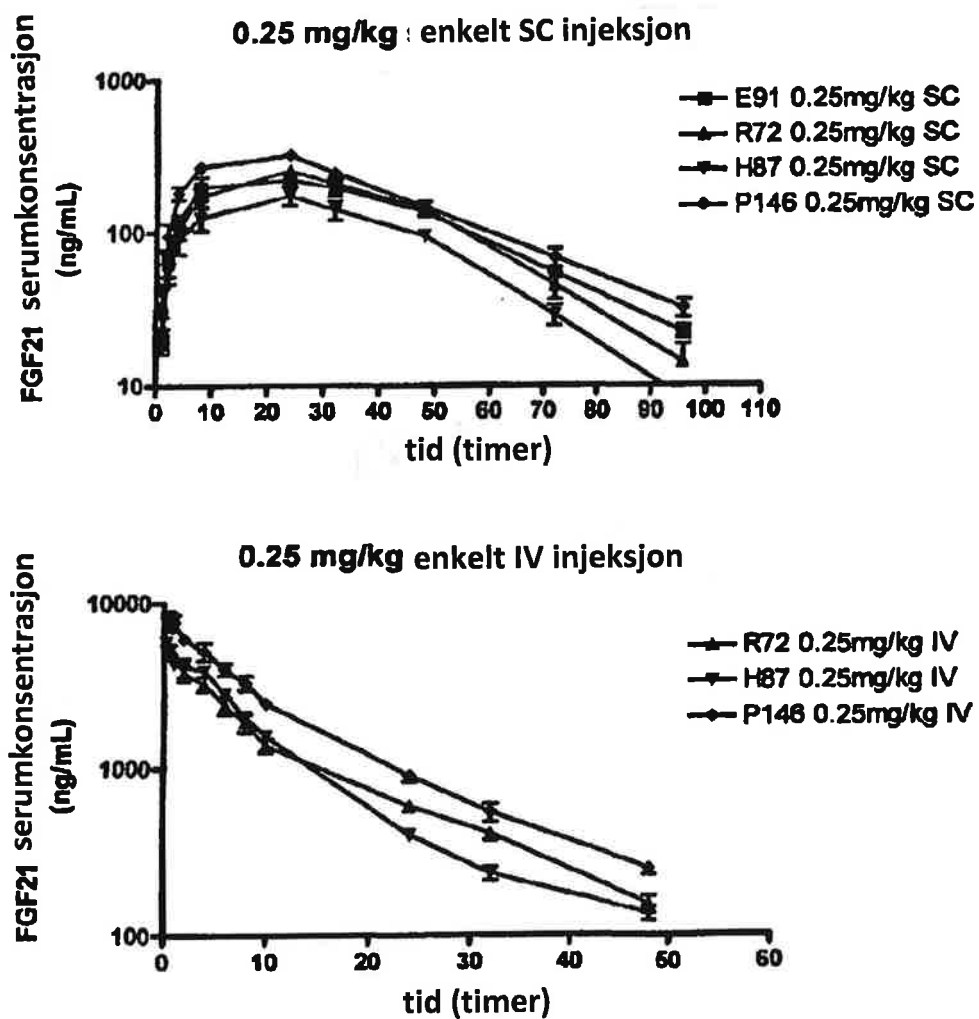


\* Redusert biotilgjengelighet

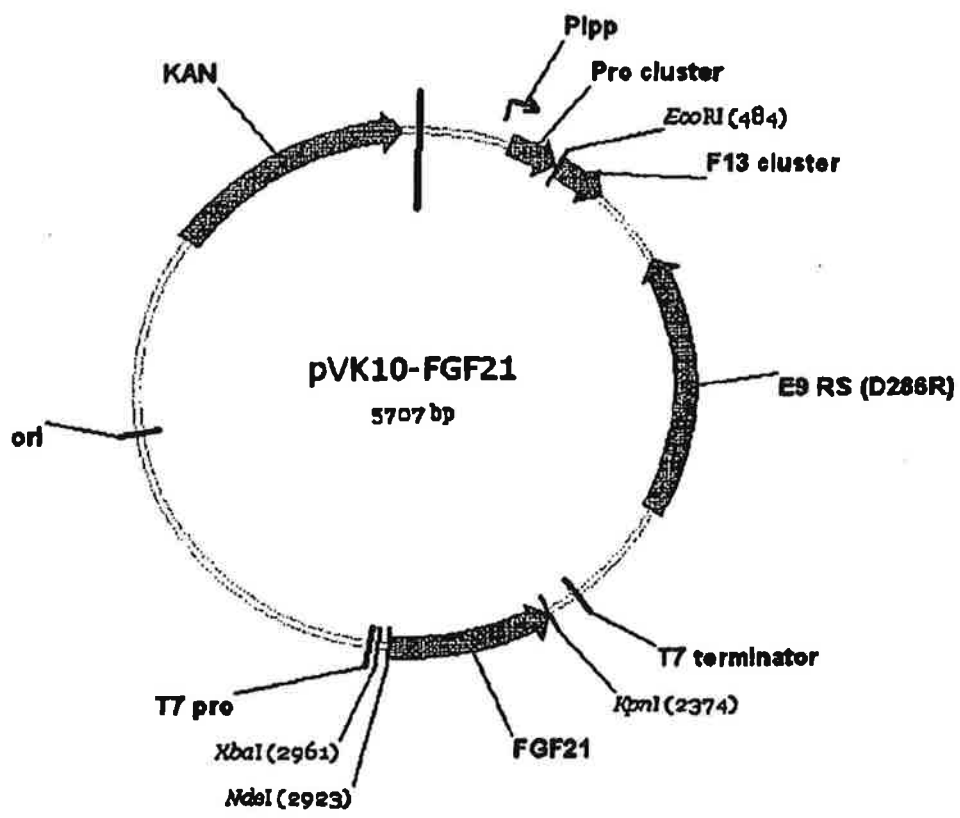


Figur 23

## PEG PK sammenligning del 2



Figur 24



Figur 25

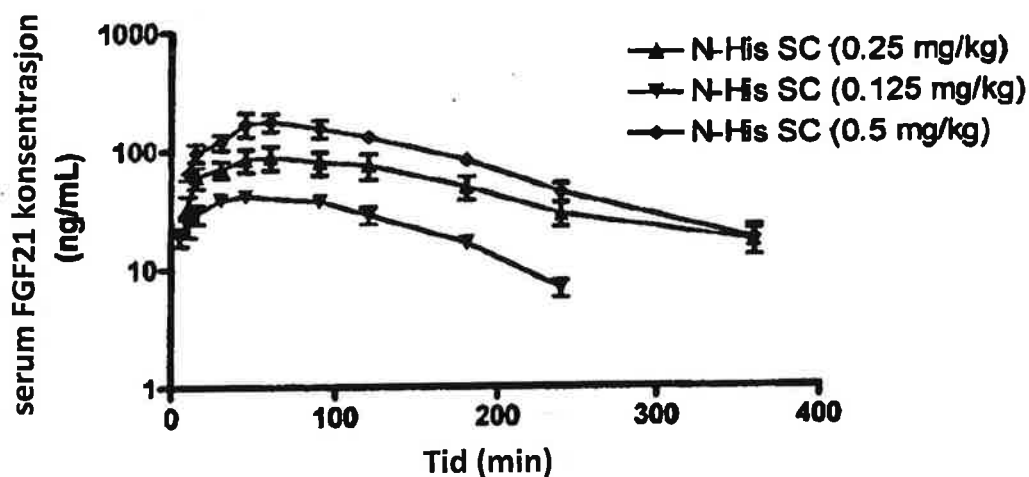
## pVK10 FGF21 Sekvens

caaaatagggtccgpcacatftcccgaaaagtccactgaaattgtaaacgacgtctaagaaccattattatcatgacattaacataaaaaataggcgatcacgaggcc  
 ctttcgcttcaagaattaccggggatccaccggacagcgggtgaggactgtgtaacacagaataagaatgaggccgctcatggcggtgpcgctctttagcgaacgac  
 aaaaaaagtgaggcccccacaaaaaattctcaacataaaaaactttgtgtaantactgtaacgctgaatggccctgtgggtagcctgtctatcctttggattgggacct  
 gagaccaccagttcaaatctgggcaggccaccactctgtgtaattggccctgtgggtagcctggctatctcttgggattgggacccagttcaaatctgggcag  
 gccaccactctgtgtaattccggcggtgagcagcggcagaacggcggacttaaatccgcatggcgctgggtcaaatccagcccgggacacactgacgaccactcg  
 tgcggcggtgagttcagcaggccagaacggcggacttaaatccgcatggcgctgggtcaaatccagcccgggacacactgacgaccactcg  
 atgagctggagatccttagcgaagcgaaggatttttaagcttctcaatgtcgaagcggaaattaatcgcaagaaaaagcagaaaaaacccgccaacgagcggcgtttg  
 gattgttctgttcttccggatgaggcggtgaacgccttaaccggcctcaaaaagcagcaaacataatattgcagagatcatgtaggcctgataagcgtagcgcacagggc  
 aatttagcgttgaacatgacgtataatcttctcaatggctcaaaaactttataagcttctcagctacagcatttttaaccgcaatggatgcaatctcttaataa  
 ctctcatagctattaaactgtcaaatctcaccaaaattttcggcctttatggtaaaaggatattcaaggagatttagctatctccattttggttctctcaacaactccagcggg  
 cagtatgctttttatcttagccctaatctctctgagagtcacacagctataaaatccctttgaaagactcaacttctctctcaccacccgtaagacaggggttgaata  
 caaacacactttttggtaaaagctccctgtcaaacatgtagttttctctctccatccctcaactcaacatcaacgcccataatgaatcccaataacctgcatattggatagat  
 aacttcagcaacctttgatttctctctctgtatagaatccatactcttctttaaaggtagtttttaagccaatctatagacattcagtgataatccttaacagccatg  
 ttacttccataaaacatattttgcttttaacccatgctcaaaaactttttgtataactctctattttctaatctcaactcctcttctgtttaaataggcgtgtaaacgcaaat  
 alataatatacaaatccagcatittgaaatcaalactttttatgtggagataaagccctaaatgtattttaccacttggttcaaaaactataacagcagatttttcaacttttaaaac  
 ctctttaaactctctcctcgtgataaattcagatgtttcttataactcgaatctgccaatgtattttaccacttggttcaaaaactataacagcagatttttcaacttttaaaac  
 aggcctgacaaccgagatcttcaactcagcaaaagctgatttattcaacaagccgctcctcagcagcgtatgtctgccaagtgttacaacaaatcaactctg  
 attagaaaaactatcagcagatcaaatgaaactgaaggttaagcggtagttatcacagttaaattgtaacgagtcaggccaccgtgtatgaaatcaacatcgctcatcgtc  
 atcctcggcaccgtcaccctggatgctgtaggcataggttggttatccgggtactcgggctctcgggatacgggataatgctctcttccagcaaaaaacccctcaaga  
 cccgttagaggcccaaggggttagctgatttctcagcggggcagcagcaactcagcttcttccggctttgtagcagcgttagtaacctatgacgcgtaactagga  
 gagcgaactgtgacggactcaccatcagcagaggaactgaacctccgacgtcggagggtcggagccagaataccgggtgtcaggtgtcaggtgagcagccagc  
 agtgacgaaaacgggcccggaccggcggggcaggggtcagcagatgagaggactttgtaccaggcagatgagaggcagaccgtgtgtcactctgatacactgtaaccatc  
 tccaagcagcagtcgcaaaaactcaagcctcaggatcaaaaatgagcagccatacagtcacccgtaggacgttgccacaggaaacgactcgttctacgccaggaact  
 gaatgacccaggctcagggcttcaagtgtagcagcagtgactcgggattgtagcggcagccctccgacagtcctcctcagcagatcctcagggtgagcctcagctgtg  
 atcgtcgggtgtagcaggttaacgtggcgcactgaccacaaaattgtagtaaaaggagaagaatcaggaatgagtagcatatgataatctcttcaaaagtaaaacaaaatatttcta  
 gagggaaccggtgtggtctccctatgtgagctgattaaattcggggatcagatctcgggacagcgttggctctggccacgggtgcaalactgtcctctgctgtgagg  
 accggctagcgtgggggttgcctactggttagcagaatgaatccgatacggagcgaacgtgaagcagactgtctgcaaaaactgtcgcagctgagcaacaacal  
 aatggtctcgggttcgttctgtaaaactcggaaacggagagtcagcgcctgcaccattatgtccgagatctgcatcgaggatgctgtcggctaccctgtggaacactac  
 atctgtatlaacgaagcgtgcaattgaccctgagtgattttctctgtcccgccgcaiccataccgagttgttaccctcaaacgttccagtaaccgggcaigtctatcag  
 taaccctatcgtgagcactcctctctgttcaatcggatcattaccatgaacagaaatccctctacacggagcagcagtagcacaacaggaaaaaacccgcttaacatg  
 gccgctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaactcaacgagctggagcggatgaacaggacagatctgtaaatcgttcaacgaccagcgtgagctttac  
 cgcagctcctcgcgcttctgtgtagcgggtgaaaaactctgacacatgagctccggagacgggtcagactgtctgtaagcggatgcccgggacagcaaacccgtc  
 agggcgcgtcagcgggtgtggtggcgggtgtcggggcggcagccatgaccagtcagtagcagatgagggtgtatactggcttaactatgcccagcagagcagattgactga  
 ggtgaccataatagcgggtgaaatccgcacagatgctgaaggagaaaaatccgcatcaggcgtcttccgctctcctcctcactgactcgtgctcgtcgttccgctg  
 cggcagcgggtatcagctcactcaaaaggcgttaatccggtatccacagaalccaggggataacggaggaagaaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccg  
 taaaaaggccgctgtgctgctgtttccataggtctccgccccctgacagcagcacaacaaatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggaactataaagatacc  
 aggctttcccccggaaagctccctcgtcgtctcctgttccgaccctcggccttaccggataactctcggccttctccctcgggaaagcgtggtgcttctcatagctacgctg  
 taggtatctcagttcgggttaggtcgttcgtccaagctgggctgtgtgacgaacccccgggtcagccgaccgctcggccttaccgtaactatcgttctgagccaaaccggt  
 aagacacgacttaccgactcggcagcagcactggtaacaggatagcagagcggatgtaggggtgctacagagttctgaaagggtggtgcttaactaactcggctacactag  
 aaggacagatttggatctgcctcgtctgaaagcagttactctcggaaaaagagttgtagctcttgaatccggcaaacaaaccccgctgtagcgggtttttgtttgcaag  
 cagcagattaccgpcagaaaaaaggatcagaagatcctttgaltctttctacggggtctgacgctcagtggaacgnaaacctacgttaagggttttggctatgaacaataa  
 aactgtctctitacataaacagtaatacaagggtgttatgagccatattcaacgggnaaacgcttctgtagggcggattaaatccaacatgtagctgattatagggataaa  
 tggctcgcgataatgctgggcaatcaggtgagcaaatctatcagattgtaggaaagccgatgcccagagttgttctgaacatggcgaagtagcgttgcgaatgattac  
 agatgagatggtcagactaaactggtgacggaattatgctcttccgacacaaagcaattttacgtaactcctgatgagcatggttactaccactgcatccccgggaaac  
 agcattccaggtattagaagaataatcctgattcaggtgaaaaatattgttagctggcagctgtcctcggcgggtgcatcagttcctgtttgtaattgtcttttaacgagcgtc  
 glattcgtctcgtcagggcgaatcagcaaatgaaacgggttgggtgagcagagattgtgacgagcgttaagctgctgctgttgaacaggtctggaagaaatgcaataa  
 ctttgcattctcaccgactcagctcactcatggtgatttctacttgaacactattttgacggggaaataataggttattgattgttggacgagtcggaatcgcagacc  
 gataccagagctgccalctatggaactgctcgttgagtttctctcactcaactcagaacggccttttcaaaaataggtattgataatccctgataatgaaatgcaattcattga  
 tgcctgatgattttcaagaataattcagcagggatacatattgaaatgatttagaataaa

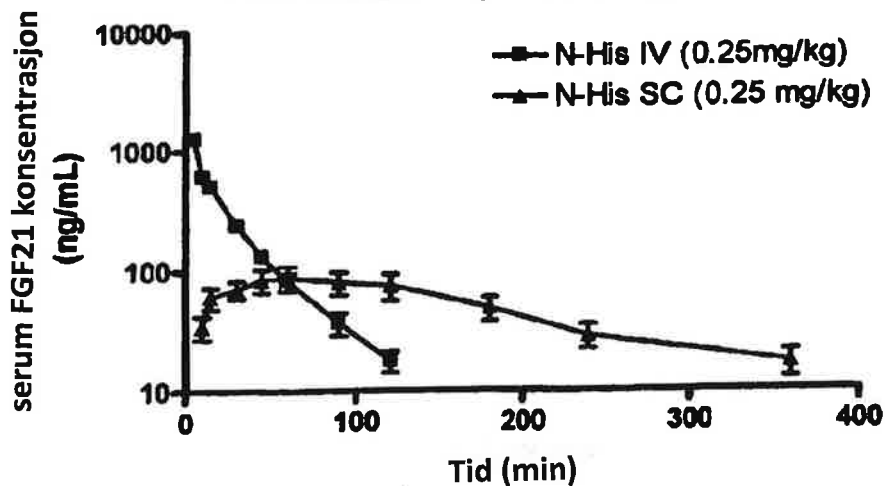
Figur 26

**Farmakokinetisk evaluering av vill-type (WT) N-His 6 tagget FGF21**

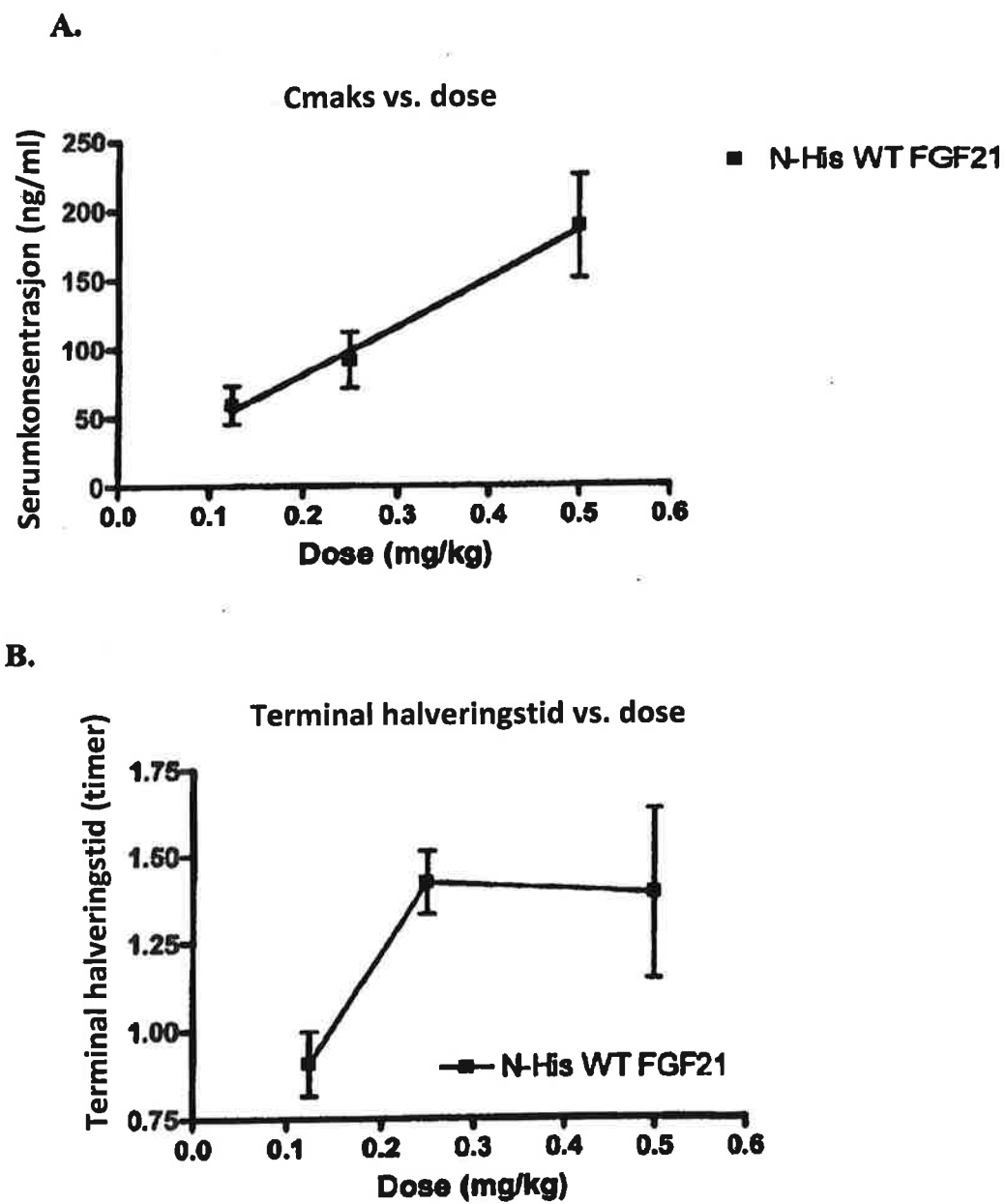
N-His WT FGF21 serumkonsentrasjon  
etter enkelt SC injeksjon i rotte



N-His WT FGF21 serumkonsentrasjon  
etter enkelt SC injeksjon i rotte

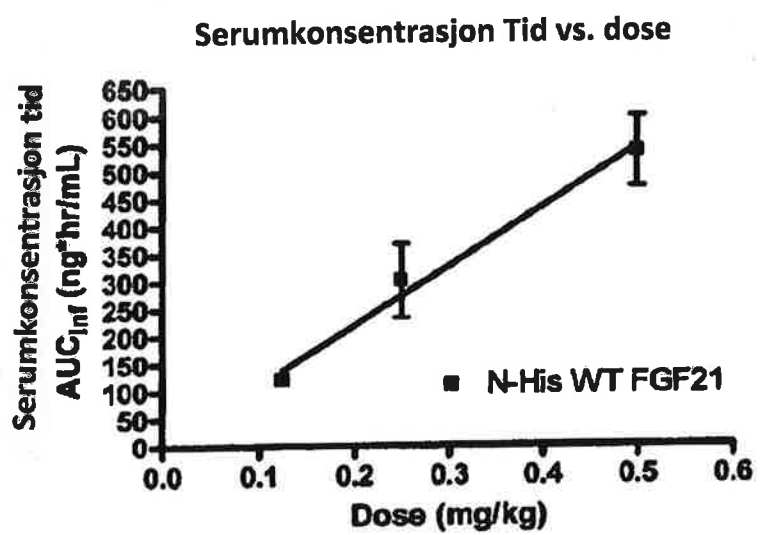


Figur 27



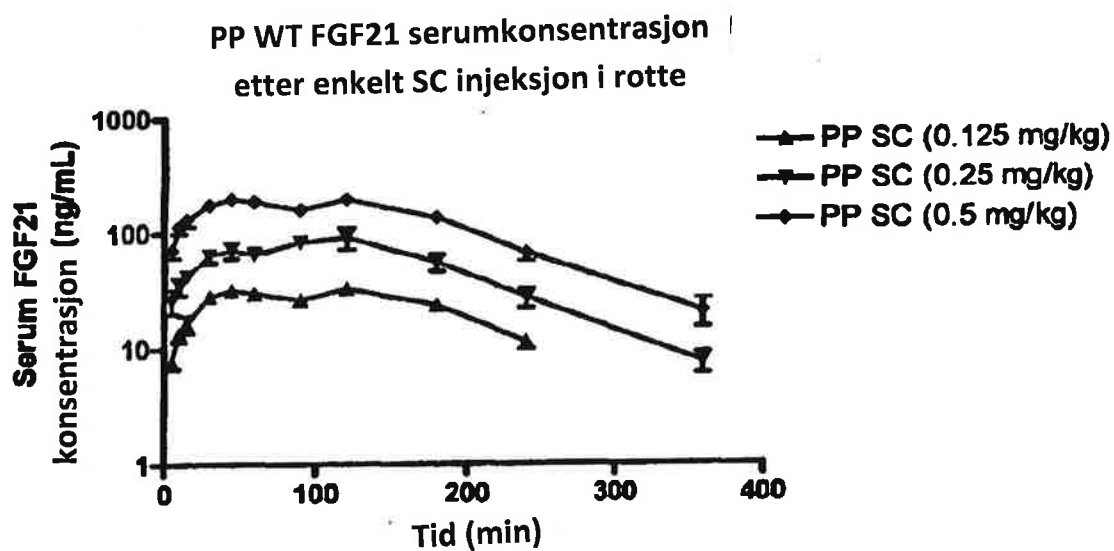
Figur 27 (fortsatt)

C.

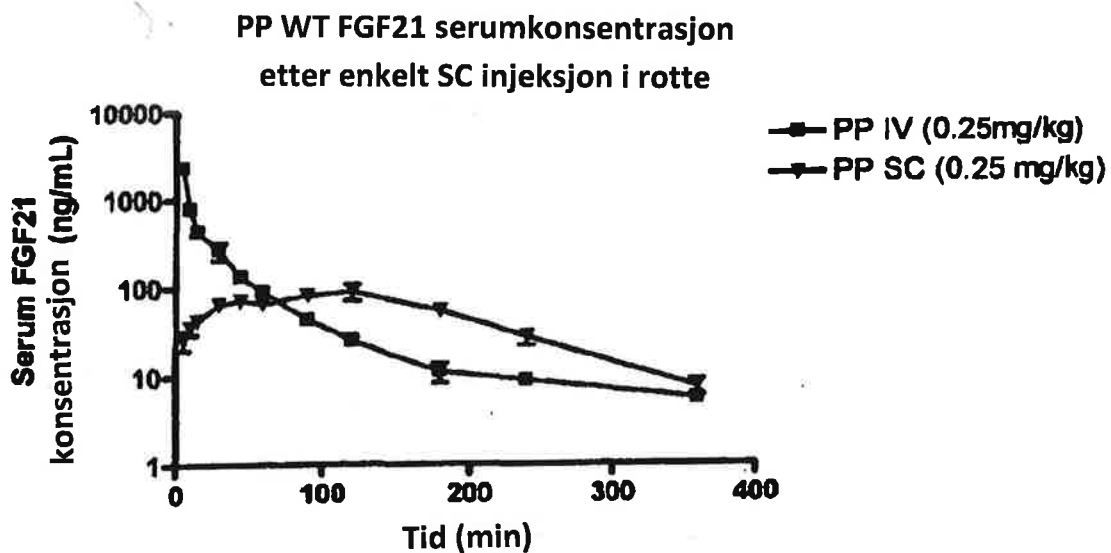


Figur 28

A.

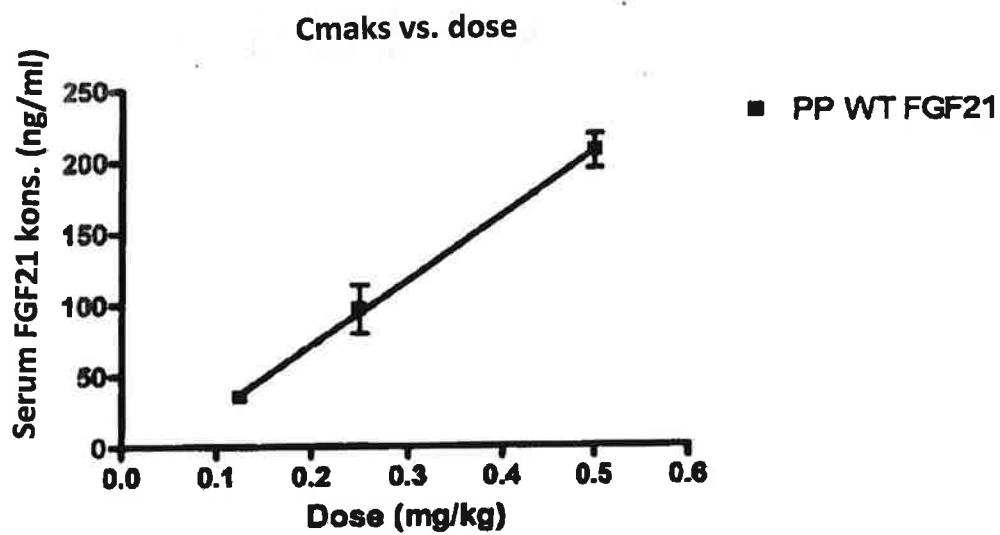


B.

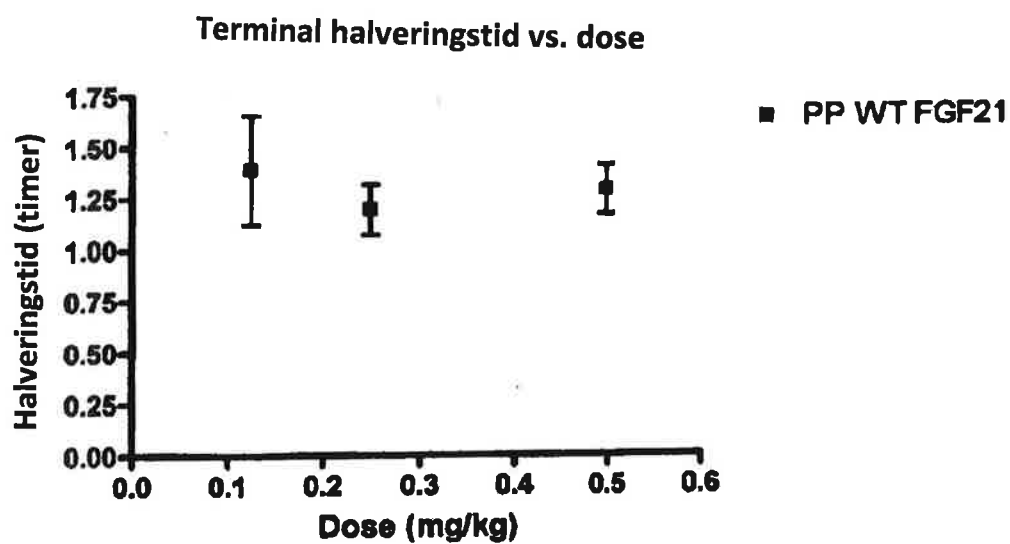


Figur 29

A.



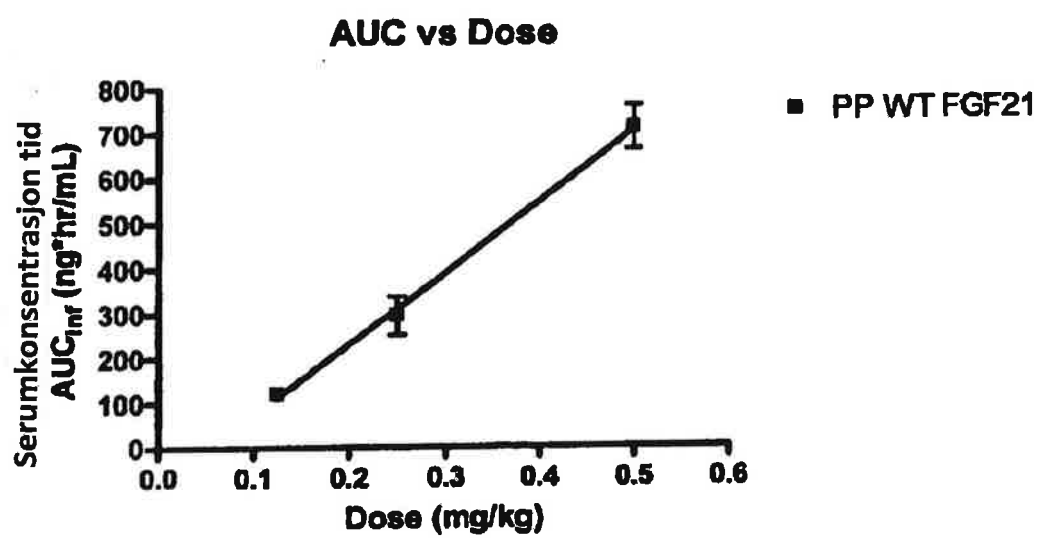
B.



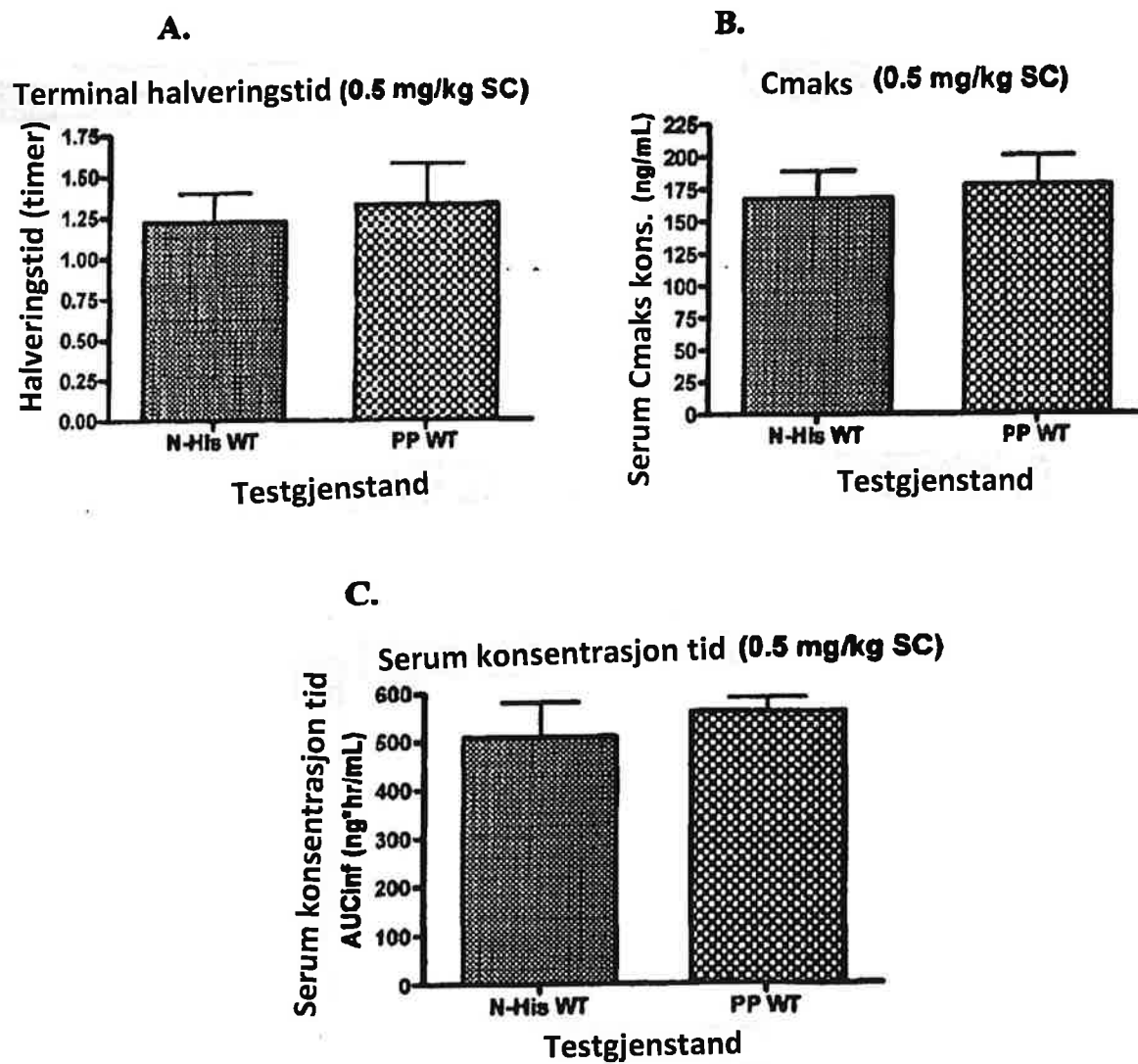


Figur 29 (fortsatt)

C.

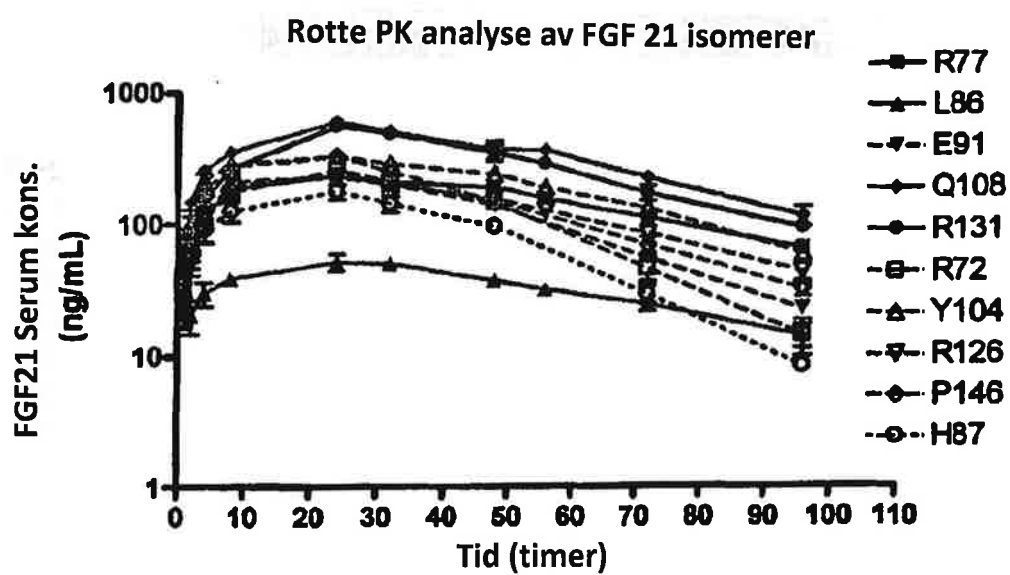


Figur 30

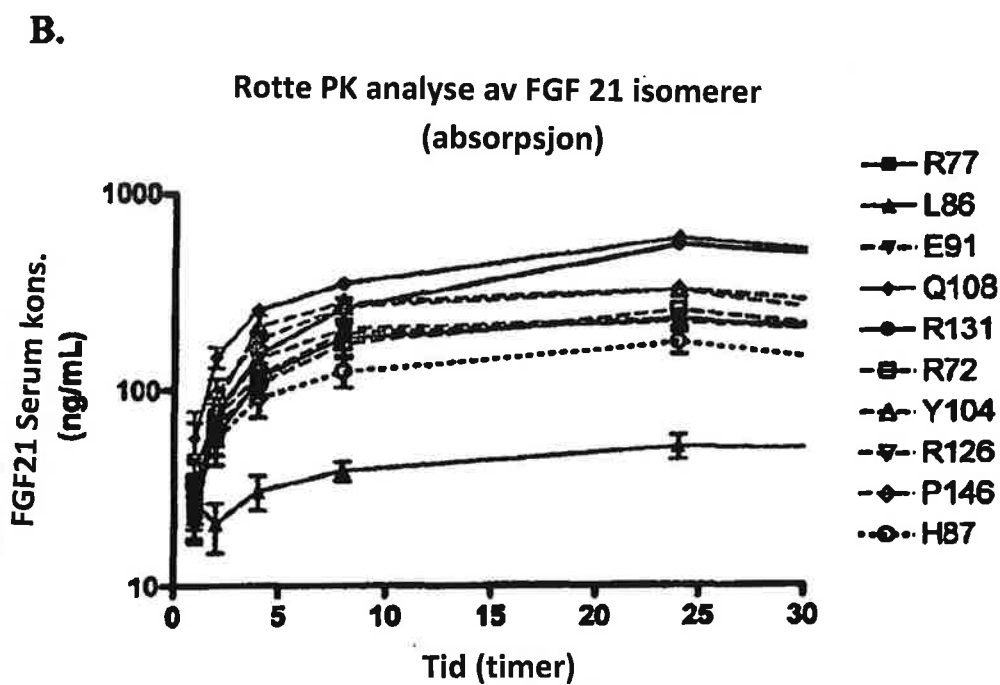


Figur 31

A.

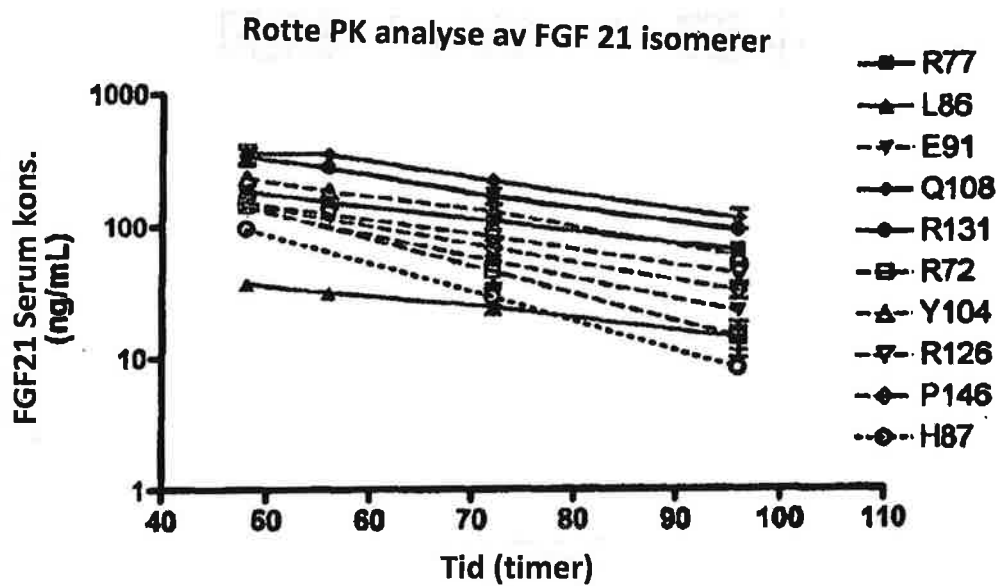


Figur 31 (fortsatt)

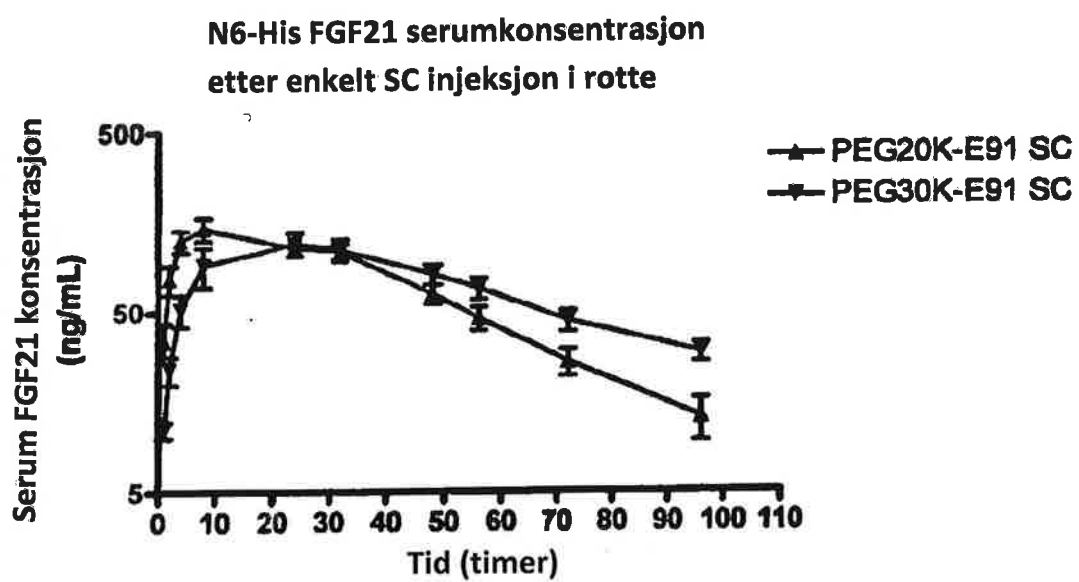


Figur 31 (fortsatt)

C.

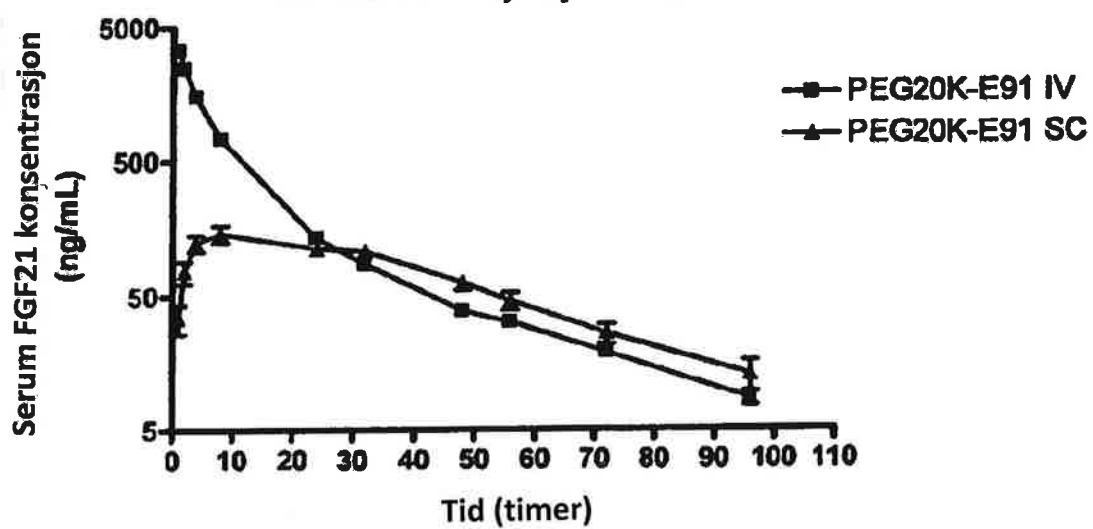


Figur 32



Figur 33

N-His WT FGF21 serumkonsentrasjon  
etter enkelt SC injeksjon i rotte



Figur 34

## Sekresjon av FGF21 i e. coli

