

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 495**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

C07K 14/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2010 PCT/EP2010/050720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.07.2010 WO10084169**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2010 E 10701661 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2389190**

54 Título: **Derivados del FGF21 con aglutinante de albúmina A-B-C-D-E- y sus usos**

30 Prioridad:

23.01.2009 EP 09151227

05.02.2009 EP 09152144

08.07.2009 EP 09164904

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

03.12.2018

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

TAGMOSE, TINA MØLLER;

GARIBAY, PATRICK WILLIAM;

ANDERSEN, BIRGITTE;

WANG, JISHU;

CONDE FRIEBOES, KILIAN WALDEMAR;

BAK-JENSEN, KRISTIAN SASS;

THØGERSEN, HENNING;

WÖLDIKE, HELLE;

NIELSEN, PETER KRESTEN;

SLAABY, RITA;

ZHANG, XUJIA y

WIECZOREK, BIRGIT

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 692 495 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados del FGF21 con aglutinante de albúmina A-B-C-D-E- y sus usos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21 (FGF21), más en particular, a los derivados de compuestos del FGF21 que tienen un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente. La invención se refiere, además, a análogos novedosos del FGF21, así como también al uso farmacéutico de estos derivados y análogos del FGF21, en particular, para el tratamiento de la diabetes, la dislipidemia, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, el síndrome metabólico y/o la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD).

Los derivados de la invención son prolongados, por ejemplo, capaces de mantener un bajo nivel de glucosa en sangre durante un período de tiempo más largo, capaces de aumentar la vida media in vivo del FGF21 y/o resultan en un aclaramiento más bajo del FGF21. Los derivados de la invención son, preferentemente, además, de una estabilidad oxidativa mejorada.

20 Antecedentes de la invención

Los factores de crecimiento de fibroblastos son polipéptidos expresados en tejidos adultos y en desarrollo. Están involucrados en diversos mecanismos fisiológicos, que incluyen, por ejemplo, la regulación metabólica y la diferenciación celular. Existe una familia completa de más de veinte factores de crecimiento de fibroblastos (la familia FGF). Tres miembros de la familia FGF, que incluye FGF19, FGF21 y FGF23, forman una subfamilia que funciona como factores endocrinos involucrados en la regulación metabólica.

El factor de crecimiento de fibroblastos 21 o FGF-21, en la presente descripción referido por la denominación corta FGF21, se expresa, preferentemente, en el hígado y se ha demostrado que ejerce efectos metabólicos similares a las hormonas.

Por ejemplo, se ha demostrado que el FGF21 activa la captación de glucosa en los adipocitos de ratón, para proteger a los ratones de la obesidad inducida por la dieta cuando se sobreexpresa en ratones transgénicos y, cuando se administra a roedores diabéticos disminuye los niveles de glucosa y triglicéridos en la sangre (Kharitonov y otros., *J. Clin. Invest.* (2005), 115:1627-1635).

Además, en monos diabéticos se ha demostrado el efecto del FGF21 en la disminución de la glucosa y de los triglicéridos en la sangre. El FGF21, además, fue capaz de disminuir las LDL y de aumentar significativamente las HDL en monos diabéticos (Kharitonov y otros, *Endocrinology* (2007), 148(2):774-81).

En ratones obesos inducidos por la dieta y en ratones ob/ob se demostró, además, que el FGF21 disminuye el peso corporal, predominantemente por un aumento en el gasto de energía y una disminución en la adiposidad (Coskun y otros, *Endocrinology* (2008), 149(12): 6018-6027).

Basado en esos resultados, se ha sugerido que el FGF21 es un agente farmacológico con potencial para tratar la diabetes, la dislipidemia, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico. El síndrome metabólico incluye aspectos como la resistencia a la insulina, la dislipidemia, la obesidad visceral y la hipertensión, ver, por ejemplo, la definición de síndrome metabólico en Grundy y otros., *Circulation* (2004), (109): 433-438.

El FGF21 puede usarse, además, como un agente farmacológico con un potencial para tratar la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD), ver Coskun y otros *Endocrinology*, 2008 citado anteriormente, y Xu y otros., *Diabetes* (2009, 58(1):250-9, publicado electrónicamente el 07-OCT-2008 antes de la impresión). La NAFLD fue definida por Erickson, *J. Lipid Res.* (2008), publicado electrónicamente el 12-DEC-2008 antes de la impresión. Yie y otros estudiaron el papel de los extremos N y C del FGF21 en la interacción y activación del receptor, ver *FEBS Letters*, 583 (2009), 19-24.

El documento núm. WO 2003/011213 A2 describe un método para tratar la diabetes de tipo 1 y 2, o la obesidad, mediante el uso de compuestos del FGF21 con al menos el 95 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos precursora del FGF21.

El documento núm, WO 2003/061712 A1 describe muteínas del FGF21 con propiedades farmacéuticas mejoradas, por ejemplo, A145E.

El documento núm. WO 2005/091944 A2 describe derivados PEGilados del FGF21, FGF21-K59C, y FGF21-K122C. El documento núm. WO 2005/113606 A2 describe diversas proteínas de fusión del FGF21 con la porción Fc de una inmunoglobulina IgG4, o con la albúmina de suero humano.

El documento núm. WO 2006/028595 A2 describe otras muteínas del FGF21 con capacidad disminuida para la O-glicosilación cuando se expresa en levadura, por ejemplo, L118C-A134C-S167A.

5 El documento núm. WO 2006/028714 A1 describe otras muteínas del FGF21 con susceptibilidad disminuida para la degradación proteolítica cuando se expresa en levadura, por ejemplo L153I.

El documento núm. WO 2006/065582 A2 describe aún otras muteínas del FGF21 con deamidación disminuida, por ejemplo, des-HPIP-L118C-A134C-N121D.

10 El documento núm. WO 2006/078463 A2 describe un método para tratar enfermedades cardiovasculares mediante el uso del FGF21 maduro natural o variantes especificadas de este.

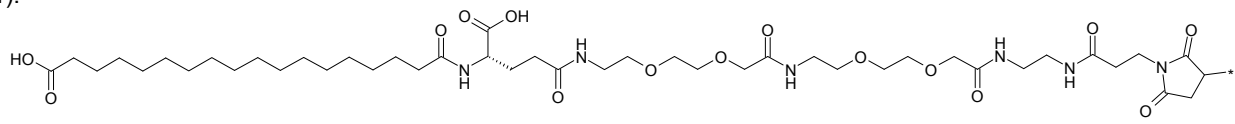
15 El documento núm. WO 2008/121563 describe polipéptidos del FGF21 modificados para incluir aminoácidos no codificados de forma natural, así como también derivados de estos.

Breve descripción de la invención

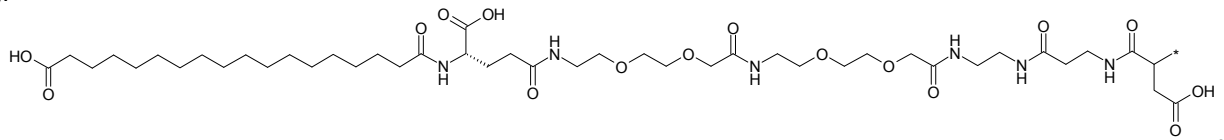
Brevemente, esta invención es como se define en la reivindicación 1, más abajo.

20 La presente invención se refiere a derivados de compuestos del FGF21 que tienen un aglutinante de albúmina unido covalentemente al compuesto del FGF21, en donde el aglutinante de albúmina tiene la fórmula A-B-C-D-E-, en donde A-B-C-D-E- se selecciona de las siguientes fórmulas (1)-(8):

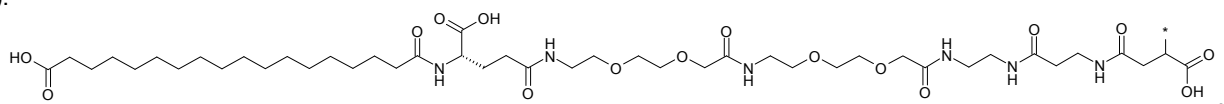
25 (1):



(2):

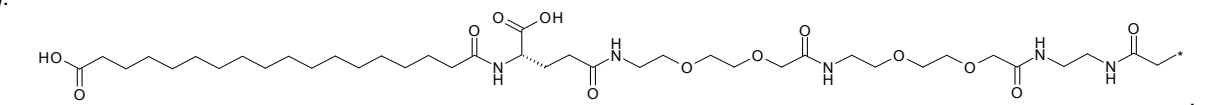


30 (3):

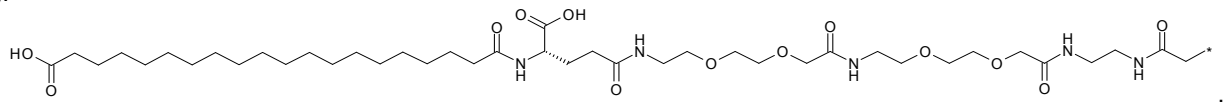


(4):

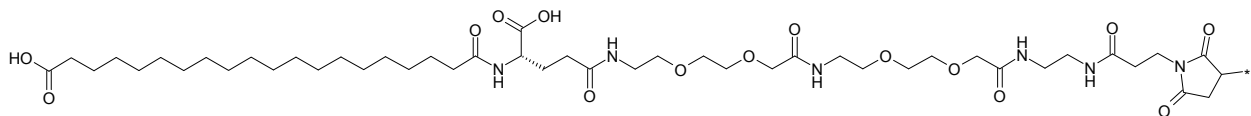
35 (5):



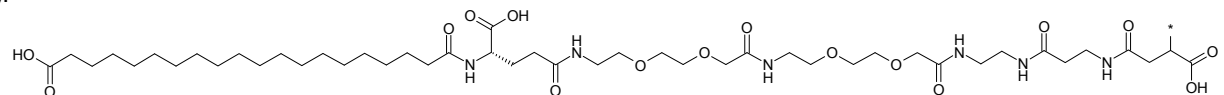
(5):



40 (6):

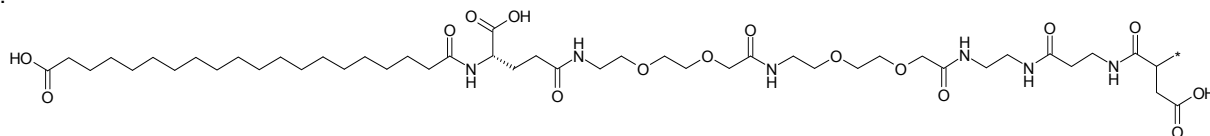


(7):



y

(8):



5

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los derivados correspondientes. La invención se refiere, además, al uso de los derivados de la invención en composiciones farmacéuticas, en particular, para el tratamiento de la diabetes, la dislipidemia, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, el síndrome metabólico y/o enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD).

10

Los derivados de la invención son prolongados, por ejemplo, capaces de mantener un bajo nivel de glucosa en sangre durante un período de tiempo más largo, capaces de aumentar la vida media in vivo del FGF21 y/o resultan en un aclaramiento más bajo del FGF21. Los derivados prolongados del FGF21 conservan una actividad biológica satisfactoria y pueden administrarse con menos frecuencia. Los derivados son preferentemente, además, de una estabilidad oxidativa mejorada.

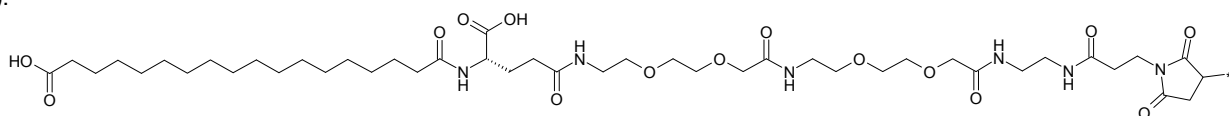
15

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a derivados de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente, en donde A-B-C-D-E- se selecciona de las siguientes fórmulas (1)-(8):

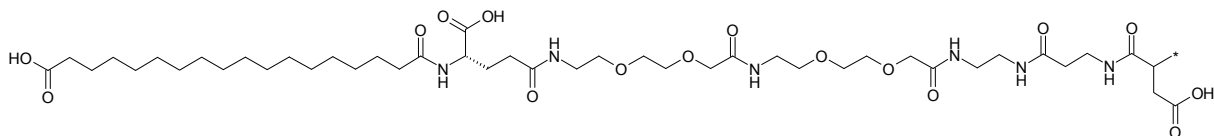
20

(1):

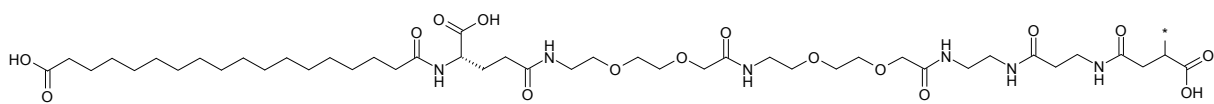


25

(2):

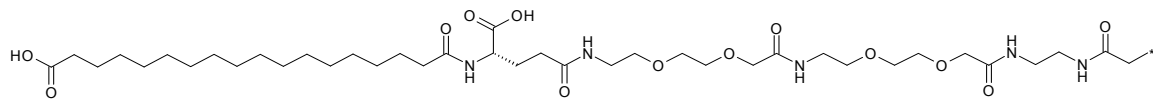


(3):



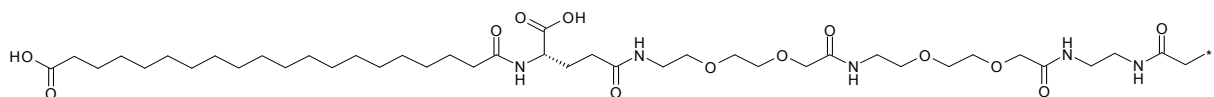
30

(4):

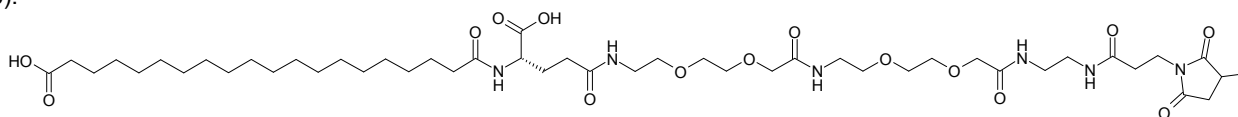


35

(5):

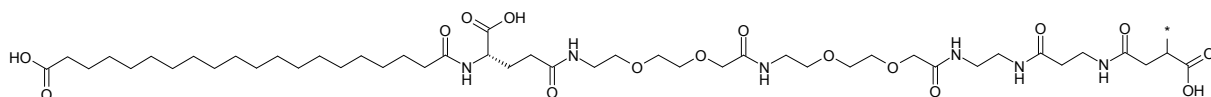


(6):



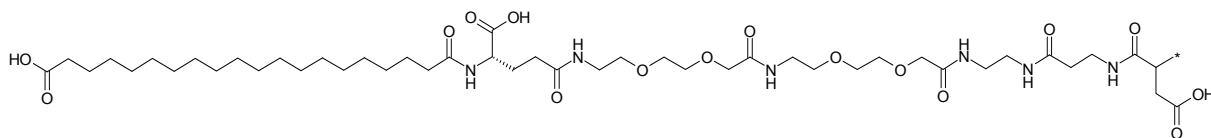
40

(7):,



y

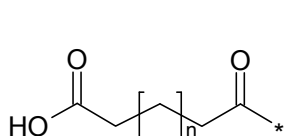
5 (8):



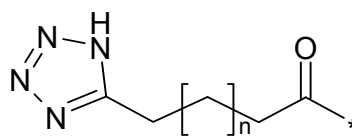
o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los derivados correspondientes

10 La descripción incluye derivados en donde

A- es un elemento de la fórmula I, II o III:

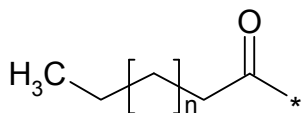


(fórmula I),



(fórmula II) o

15

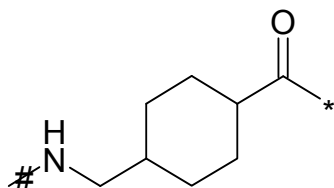


(fórmula III);

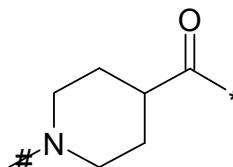
en donde n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19, y * es el punto de unión a -B-;

20 -B- está ausente, representa un enlace o se selecciona a partir de -B1-, -B2- o sus combinaciones, en donde

-B1- es un elemento de la fórmula IV, V, VI o VII:

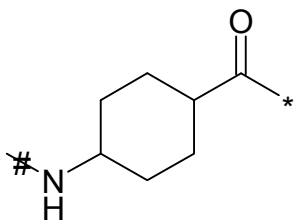


(fórmula IV o Trx),

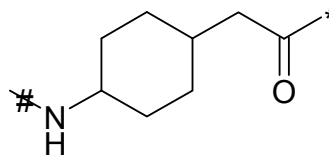


(fórmula V o Inp),

25



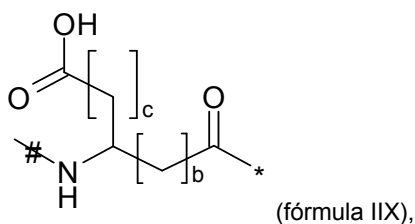
(fórmula VI) o



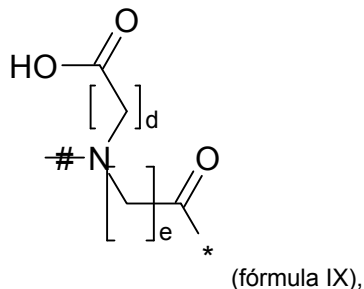
(fórmula VII);

en donde * es el punto de unión a -B2- o -C-, y # es el punto de unión a A- o -B2-; y

30 -B2- es un elemento de la fórmula IIX, IX o XXVIII o una combinación de hasta cuatro elementos de la fórmula IIX y/o la fórmula IX y/o la fórmula XXVIII:



en donde b es 0, 1 o 2, c es 0, 1 o 2, con la condición de que b es 1 o 2 cuando c es 0, y b es 0 cuando c es 1 o 2, * es el punto de unión a -C-, -B1- u otro -B2-, y # es el punto de unión a A-, -B1- u otro -B2-;

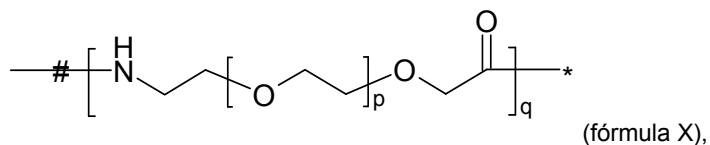


en donde d es 1 o 2, e es 0, 1 o 2, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-; o

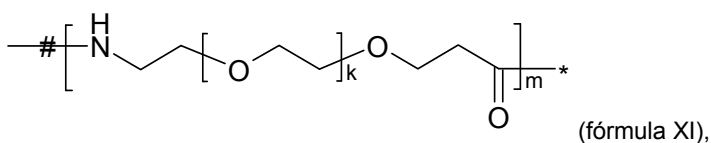


en donde u es 2, 3 o 4, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-;

-C- está ausente, representa un enlace o es un elemento de la fórmula X o XI:

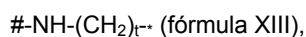
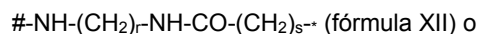


en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, q es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -B-; o



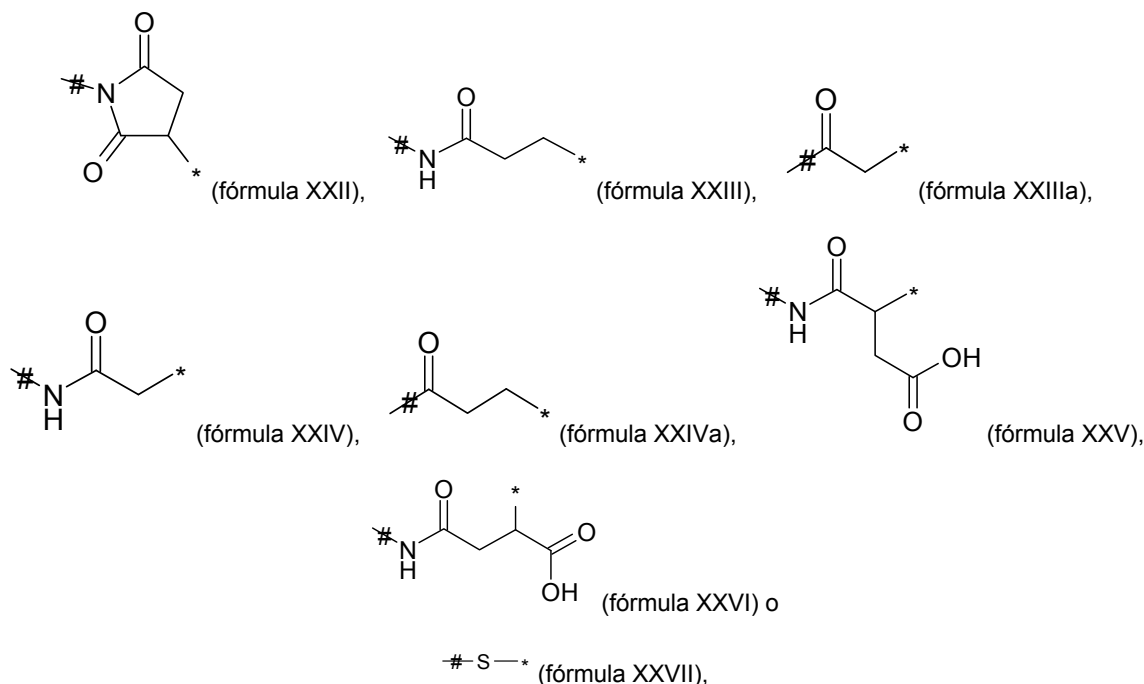
en donde k es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 o 23, m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21; y # es el punto de unión a -B-;

-D- está ausente, representa un enlace o es un elemento de la fórmula XII o XIII:



en donde r es 2, 3, 4 o 5, s es 1, 2, 3 o 4, t es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -C-;

-E- está ausente, representa un enlace o es un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIIIa, XXIV, XXIVa, XXV, XXVI o XXVII:



en donde * es el punto de unión al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -D- o -C-;

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

La descripción incluye, además, análogos del FGF21 que comprenden (a) al menos una de las siguientes modificaciones en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, K122R, I152K, L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, y/o S181K,R; de manera independiente, opcionalmente con un N-terminal M (por ejemplo, -1M); y/o (b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, de hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia de hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia de hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia de hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, con mayor preferencia al menos el 70 %, incluso con mayor preferencia al menos el 80 %, o con la máxima preferencia al menos el 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son G o S. La sec. con núm. de ident.:1 es el péptido FGF21 humano maduro de tipo silvestre que tiene 181 residuos de aminoácidos.

Finalmente, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad con eficacia terapéutica de los derivados de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable; así como también para usar en los métodos para tratar a un paciente que presenta diabetes, dislipidemia, obesidad, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y/o enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), que comprende administrar al paciente una cantidad con eficacia terapéutica de un análogo, derivado o composición de la invención.

En un aspecto, el derivado de la invención tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente a un grupo tiol del compuesto del FGF21, es decir, a un residuo de cisteína.

Los derivados de esta invención tendrán un efecto biológico similar al del FGF21, por ejemplo, en relación con el efecto de la disminución de la glucosa, la mejoría de la dislipidemia, de la obesidad, de las enfermedades cardiovasculares, del síndrome metabólico y/o de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD)

Definiciones

El término "compuesto del FGF21" como se usa en la presente descripción se refiere al FGF21 humano natural así como también a los análogos de este.

La secuencia de la proteína FGF21 humana natural está disponible en la base de datos UNIPROT con número de acceso Q9NSA1. La proteína precursora de 209 aminoácidos incluye un péptido señal (aminoácidos 1-28) y una proteína madura (aminoácidos 29-209). La proteína madura se incluye en la presente descripción como la sec. con núm. de ident.:1 (aminoácidos 1-181), y el péptido señal como la sec. con núm. de ident.:2 (aminoácidos 1-28).

En la presente descripción se conoce una isoforma o forma alélica del FGF21 humano natural que tiene una Pro en lugar de Leu en la proteína madura en la posición 146 de la sec. con núm. de ident.:1, a partir del documento núm. US2001012628 A1 (residuo núm. 174 de la sec. con núm. de ident.:2 en la solicitud publicada en Estados Unidos).

- 5 En la presente descripción se conoce otra isoforma que tiene un péptido señal más corto en el que falta Leu en la posición 23 de la sec. con núm. de ident.:2, a partir del documento núm. WO 2003/011213 (ver la sec. con núm. de ident.: 2 de la publicación WO que tiene un péptido señal de 27 residuos de aminoácidos).

10 Por lo tanto, los ejemplos particulares del FGF21 humano natural son: La sec. con núm. de ident.:1, que tiene la sustitución L146P, así como también cualquiera de esas secuencias precedidas por el péptido señal de 27 o 28 aminoácidos referido anteriormente. Los ejemplos preferidos del FGF21 humano natural son las partes maduras, a saber, la sec. con núm. de ident.:1 y la isoforma L146P de esta.

15 El término "análogo" como es referido en la presente descripción en el contexto del FGF21, es decir, un análogo del FGF21, se refiere a polipéptidos que son, o que pueden deducirse o derivarse del FGF21 natural, a partir de la sec. con núm. de ident.:1 en particular, mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos de esta. Tal modificación, enmienda o cambio puede incluir la sustitución, eliminación y/o adición de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden añadirse y/o eliminarse en el C-terminal, en el N-terminal o, internamente, en la secuencia de aminoácidos. Preferentemente, los aminoácidos se añaden y/o se eliminan en el C-terminal y/o N-terminal, con mayor preferencia, en el N-terminal. Como se conoce en la técnica, las secuencias de aminoácidos con aminoácidos eliminados en el C-terminal o N-terminal pueden denominarse, además, como secuencias truncadas. Igualmente, los aminoácidos añadidos internamente en la secuencia pueden denominarse como inserciones. En la presente descripción el término "variante" o "muteína" algunas veces se usa en lugar del término "análogo".

25 Un ejemplo de un análogo del FGF21 es la forma truncada del FGF21 natural maduro en el que se eliminan los cuatro residuos de aminoácidos del N-terminal de la proteína madura (HPIP), que se describe en, por ejemplo, el documento núm. WO 2006/065582. Se dice que esta forma truncada estimula la captación de glucosa en adipocitos de ratón 3T3-L1 al mismo nivel que el FGF21 de tipo silvestre. Esta proteína tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 5-181 de la sec. con núm. de ident.:1 en la presente descripción.

30 Un ejemplo adicional de un análogo del FGF21 es el polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1 que tiene una Met en el N-terminal (designado, además, como "Met-FGF21" o como la sustitución -1M ((menos 1)M) de la sec. con núm. de ident.:1). Cuando el compuesto del FGF21 se expresa en *E. coli* se añade una Met en el N-terminal, ver, por ejemplo, el documento núm. WO 2006/050247, Tabla 6.

35 Otros ejemplos de análogos del FGF21 son las secuencias modificadas del FGF21 (frecuentemente denominadas muteínas) que se describen en, por ejemplo, en los documentos núms. WO 2003/061712, WO 2005/091944, WO 2006/028595, WO 2006/028714, WO 2006/065582 y WO 2008/121563 (compárese la sección de la técnica anterior en la presente descripción).

40 Aún otros ejemplos de análogos del FGF21 se describen en la parte experimental de la presente descripción, así como también en las reivindicaciones adjuntas.

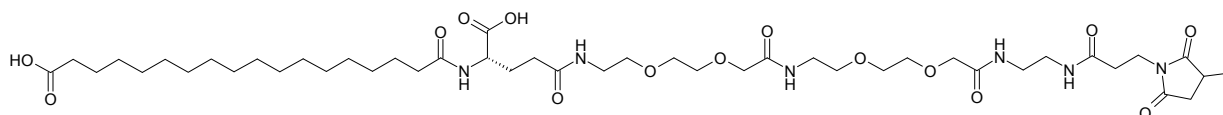
45 El término "aminoácido" o "residuo de aminoácido" como se refiere en la presente descripción en el contexto de las modificaciones del FGF21, incluye los veinte alfa aminoácidos estándar usados por las células en la biosíntesis de proteínas y especificados por el código genético, a saber, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. El término incluye, además, los aminoácidos no estándar, como la selenocisteína y la pirrolisina, que además, están codificados por el código genético pero son raros en las proteínas. Otros aminoácidos no estándar que se encuentran en las proteínas pueden formarse por modificación postraduccional, por ejemplo, γ -carboxiglutamato e hidroxiprolina. Ejemplos adicionales de aminoácidos no estándar o no naturales que no están codificados por el código genético son la ornitina y la fosfoserina. Aún ejemplos adicionales de aminoácidos no estándar son los aminoácidos sintéticos que incluyen aminoácidos fabricados por síntesis química, por ejemplo, los isómeros D de los aminoácidos codificados por el código genético tales como D-alanina, D-glutamina, D-histidina, y D-leucina, Aib (ácido α -amino-isobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (tert-butilglicina), β -alanina, ácido 3-aminometil benzoico, ácido antranílico, des-amino-histidina (abreviado DesaminoHis, nombre alternativo ácido imidazopropiónico, abreviado Impr), los análogos beta de aminoácidos tales como β -alanina, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, N α -acetil-histidina, α -fluoro-metil-histidina, α -metil-histidina, ácido α,α -dimetil-glutámico, m-CF₃-fenilalanina (abreviado m-CF₃-Phe), ácido α,β -diaminopropiónico (abreviado Dap), 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, y ácido (1-aminociclooctil)carboxílico.

Para los propósitos actuales, los dos códigos reconocidos de los aminoácidos estándar (de una letra y de tres letras) se usan indistintamente, o algunas veces el nombre del aminoácido se especifica completamente. Estos términos, por supuesto, se consideran equivalentes completamente (por ejemplo, S = Ser = serina).

El término "derivado" como se usa en la presente descripción se refiere a un compuesto del FGF21 que se ha modificado covalentemente. El término no es limitativo como tal, sino más bien descriptivo, ya que pretende marcar una distinción entre los cambios realizados en el compuesto del polipéptido FGF21 constitutivo como tal ("análogos"), y la unión covalente de una cadena lateral al compuesto del FGF21, de manera que el compuesto es "derivado". Si se desea, este término puede sustituirse por otros términos químicos generales, por ejemplo, compuesto.

El término "aglutinante de albúmina" no pretende, además, ser limitativo como tal. Nuevamente, es bastante descriptivo, ya que refleja el objetivo general o el propósito de unir la cadena A-B-C-D-E al compuesto del FGF21, a saber, que el compuesto resultante (derivado) es capaz de unirse a la albúmina sérica humana que proporciona o al menos contribuye al efecto prolongado dirigido a los derivados de la invención. Si se desea, este término puede sustituirse, además, por otros términos químicos generales, por ejemplo, compuesto.

Nomenclatura: En la presente descripción los análogos y derivados se denominan mediante el uso, indistintamente, de la nomenclatura de polipéptidos, la nomenclatura química orgánica y fórmulas químicas, o mezclas de estas, lo que se considere más adecuado para facilitar la comprensión de la materia técnica en cuestión. Por ejemplo, el derivado del Ejemplo 4 puede denominarse S-122-[1-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil]-etil)-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys122]-Met-FGF21 (lo que significa que [Cys122] Met-FGF21 es modificado mediante 1-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil]-etil)-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il en el grupo tiol de la Cys en posición 122). Pero este compuesto puede definirse, además, como K122C Met-FGF21, derivado en C122 con el siguiente compuesto:



Nomenclatura de las variantes (Nomenclatura de los análogos): Las variantes (o análogos) del FGF21 en la presente descripción se denominan, indistintamente, mediante el uso de la nomenclatura de polipéptidos, la nomenclatura química orgánica, fórmulas químicas, secuencias de aminoácidos, o una mezclas de estas, lo que se considere más adecuado para facilitar la comprensión de la materia técnica en cuestión.

Por ejemplo, una sustitución en una variante puede indicarse como: "Aminoácido sustituido en la posición del aminoácido original". Puede usarse el código de tres letras o de una letra. En consecuencia, la notación "K122C" o "Lys122Cys" significa, que la variante comprende una sustitución de lisina con cisteína en la posición del aminoácido de la variante que corresponde a la posición del aminoácido 122 en el FGF21 (sec. con núm. de ident.:1), cuando la variante y el FGF21 se alinean como se describe más abajo ("alineación").

Las modificaciones múltiples tal como, por ejemplo, las sustituciones pueden separarse por comas (con un espacio después de la coma) y, si se desea, pueden rodearse por paréntesis para hacer evidente que pertenecen a la misma variante. El análogo que se deriva en el Ejemplo 7 puede designarse, por ejemplo, "K56R, K59R, K69R, K122R Met-FGF21" o "(K56R, K59R, K69R, K122R) Met-FGF21" o puede referirse como la "sec. con núm. de ident.:1 con K56R, K59R, K69R y K122R, y una M en el N-terminal". Ver el Compuesto Y del Ejemplo 2 para la nomenclatura de una variante con modificaciones múltiples en la forma de una mezcla de sustituciones e inserciones.

Las modificaciones alternativas tales como los sustituyentes alternativos en una posición determinada, pueden separarse mediante comas, como por ejemplo, en la designación "S181K,R", que significa que la Ser en la posición 181 puede sustituirse con Lys o Arg.

Una extensión puede describirse mediante la referencia a la sec. con núm. de ident.:1 por la adición de números de posición (números positivos continuados en el C-terminal y números negativos en el N-terminal) o, más simplemente, por la adición de los aminoácidos de la extensión en cuestión, mediante el uso de la secuencia correcta de estos, al compuesto en cuestión, al que después se le designa un nombre trivial, tal como FGF21, nuevamente para facilitar la comprensión del punto técnico relevante. Como un ejemplo el compuesto(s) MGGGGG-FGF21 designa el polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1 (FGF21) con una G en la posición -1, una G en la posición -2, una G en la posición -3, una G en la posición -4, una G en la posición -5, y una M en la posición -6, en referencia a la sec. con núm. de ident.:1. Igualmente, el compuesto (q) MS-FGF21 (o Met-Ser-FGF21) designa el polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1 (FGF21) con una S en la posición -1, y una M en la posición -2, en referencia a la sec. con núm. de ident.:1.

Una inserción en una variante puede indicarse como: "Número de la posición del aminoácido antes del índice de la inserción del aminoácido insertado". El número de la posición del aminoácido antes de la inserción se refiere a la posición del aminoácido en el FGF21 (sec. con núm. de ident.:1) justo antes del espacio, que se crea cuando la variante y el FGF21 se alinean como se describe más abajo ("alineamiento"). Para los aminoácidos, puede usarse el código de una letra o de tres letras. El índice es una letra minúscula en orden alfabético, por ejemplo, "a" para el primer residuo de aminoácido insertado, "b" para el segundo residuo de aminoácido insertado, etcétera, como sea adecuado. En consecuencia, la notación "V169aT" (o "Val169aThr") o simplemente "169aT" (o "169aThr") todas significan, que la variante comprende una inserción de treonina después de la valina en la posición 169 en el FGF21 (sec. con núm. de ident.:1), cuando la variante y el FGF21 se alinean como se describe más abajo ("alineamiento").

En los casos donde hay un puente disulfuro extra en el compuesto del FGF, las dos Cys se escriben adyacente una con respecto a la otra y se conectan mediante un guión, como, por ejemplo, en "L118C-A134C", donde hay un puente disulfuro entre la Cys en la posición 118 y la Cys en la posición 134.

Para los propósitos de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos puede realizarse mediante el uso del programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>). Una versión preferida es la 2.8.0. El programa Needle implementa el algoritmo para el alineamiento total descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453. La matriz de sustitución utilizada es BLOSUM62, la penalización por apertura de espacio intermedio es 10 y la penalización por extensión de espacio intermedio es 0,5.

El grado o el porcentaje de identidad entre la secuencia de un análogo del FGF21 de la presente invención ("secuencia de la invención"; por ejemplo, la sec. con núm. de ident.:1 con K56R, K59R, y K69R) y una secuencia de aminoácidos diferente ("secuencia extraña"; por ejemplo, la secuencia del FGF21 de sec. con núm. de ident.:1), se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención" o la longitud de la "secuencia extraña", cualquiera que sea la más corta. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

Se produce una coincidencia exacta cuando la "secuencia de la invención" y la "secuencia extraña" tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones de la superposición (en el ejemplo de alineamiento más abajo, esto se representa mediante "."). La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (por ejemplo, la longitud de la sec. con núm. de ident.:1 es 181).

Este es un ejemplo de un alineamiento de la "secuencia de la invención" y de la "secuencia extraña" que se refirió anteriormente:

```

FGF21_SEQ1      HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP
56_59_69R      HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLRALRP
*****.***

FGF21_SEQ1      GVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
56_59_69R      GVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
*****.*****

FGF21_SEQ1      NKSPHRDPAPRGPARFLPLPLGPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA
56_59_69R      NKSPHRDPAPRGPARFLPLPLGPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA
*****

                FGF21_SEQ1      S
                56_59_69R      S
                *
```

En consecuencia, el porcentaje de identidad de este análogo del FGF21 con respecto al FGF21 es $178/181 \times 100 \% = 98,3 \%$.

En la alternativa, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante el programa "align" que es un alineamiento Needleman-Wunsch (es decir, un alineamiento total). Las secuencias se alinean por el programa, mediante el uso de la matriz de puntuación predeterminada BLOSUM50. La penalización para el primer residuo de un espacio intermedio es 12, y para los residuos adicionales de un espacio intermedio las penalizaciones son 2. El algoritmo Needleman-Wunsch se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48: 443-453, y el programa de alineamientos descrito por Myers y W. Miller en "Optimal Alignments in Linear Space" CABIOS (aplicaciones informáticas en las biociencias) (1988) 4:11-17. "Align" es parte del paquete FASTA versión v20u6 (ver W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological

Sequence Analysis", *PNAS* 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA," *Methods in Enzymology* 183:63-98).

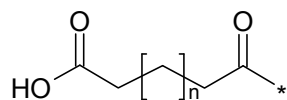
Una composición farmacéutica que comprende un derivado de un compuesto del FGF21 o un análogo del FGF21 de la invención puede comprender, además, un portador farmacéuticamente aceptable. Para inyección, el portador puede ser agua, si se desea complementado con otros materiales, por ejemplo, solución salina, como la solución salina fisiológica. Pueden usarse, además, otros agentes farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes y tampones apropiados. Además, si se desea, pueden usarse agentes adicionales farmacéuticamente aceptables, tales como emulsionantes, agentes de suspensión, solventes, rellenos, materia inerte, adyuvantes, conservantes, antioxidantes, agentes colorantes y/o agentes saborizantes. El derivado de un compuesto del FGF21 o un análogo del FGF21 pueden usarse en forma de un polipéptido purificado o un derivado de este, o puede formularse mediante el uso de excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados, como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica puede administrarse en cualquier vía como se conoce en la técnica, por ejemplo, inyectada, por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.) o por vía subcutánea (s.c.).

El derivado de un compuesto del FGF21 o un análogo del FGF21 pueden incluirse en la composición farmacéutica en una cantidad con eficacia terapéutica o profiláctica. La cantidad depende del objetivo terapéutico o profiláctico, tal como la indicación en cuestión, el estado del paciente que necesita tratamiento, la vía de administración deseada, etcétera. El médico experto puede tener que ajustar la dosificación y modificar la administración en dependencia de estos factores, como es habitual en la técnica.

Descripciones particulares

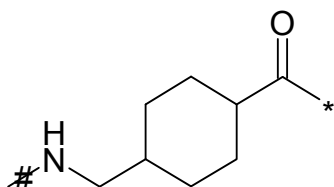
Las siguientes son descripciones particulares de los derivados adicionales en los que un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- se une covalentemente a un grupo tiol del compuesto del FGF21, es decir, por ejemplo, a un residuo de cisteína:

En una descripción, A- es un elemento de la fórmula I:

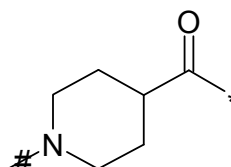


(fórmula I), en la que n es 14, 16 o 18.

En una descripción, -B- comprende -B1-, preferentemente, un elemento de la fórmula IV o V:

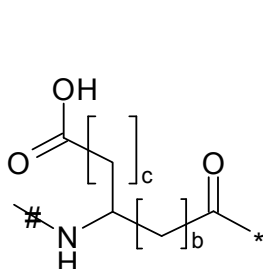


(fórmula IV) o

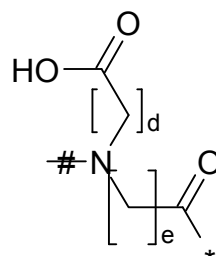


(fórmula V).

En una descripción, -B- comprende -B2-, preferentemente, uno o dos elementos de la fórmula IIX o IX:



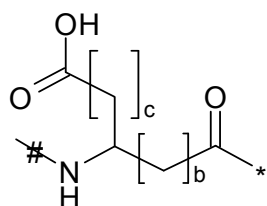
(fórmula IIX) o



(fórmula IX),

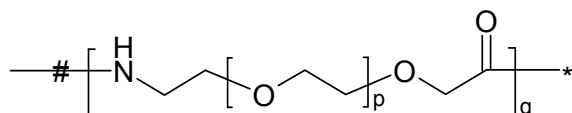
en la que, con mayor preferencia, c es 0 y b es 2 (gamma-Glu), o c es 0 y b es 1 (beta-Asp), o en la que, con mayor preferencia, d es 1 y e es 2, o d es 2 y e es 1.

En una descripción, -B- comprende -B2-, preferentemente, uno o dos elementos de la fórmula IIX:



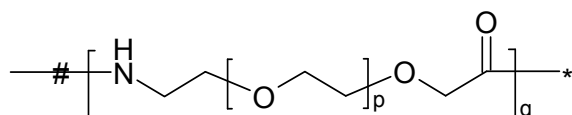
(fórmula IIX), en la que, con mayor preferencia, c es 0 y b es 2 (gamma-Glu) o c es 0 y b es 1 (beta-Asp).

En una descripción, -C- es un elemento de la fórmula X:



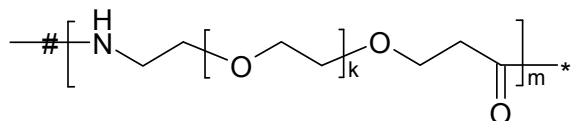
(fórmula X), en la que preferentemente, q es 0, 1, 2, 3 o 4, con mayor preferencia, q es 1 o 2.

En una descripción, -C- es un elemento de la fórmula X:



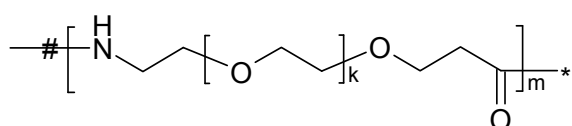
(fórmula X), en la que, preferentemente, p es 1 o 2, con mayor preferencia, p es 1, incluso con mayor preferencia, p es 1 y q es 1 o 2, o con la máxima preferencia, p es 1 y q es 2.

En una descripción, -C- es un elemento de la fórmula XI:



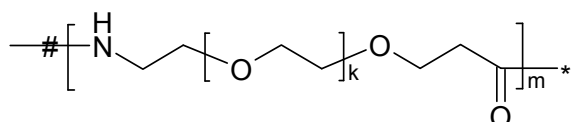
(fórmula XI), en la que preferentemente, m es 0, 1 o 2, con mayor preferencia, m es 1 o 2.

En una descripción, -C- es un elemento de la fórmula XI:



(fórmula XI), en la que preferentemente, k es 1, 2, 3, 4, 5 u 11, con mayor preferencia k es 5.

En una descripción, -C- es un elemento de la fórmula XI:



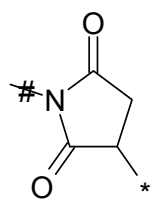
(fórmula XI), en la que m es 1 y k es 4, 5 u 11, preferentemente, m es 1 y k es 5.

En una descripción, -D- es un elemento de la fórmula XII: #NH-(CH2)r-NH-CO-(CH2)s- (fórmula XII), en la que preferentemente, r es 2, y/o en la que preferentemente, s es 1 o 2, con la máxima preferencia, r es 2 y s es 2.

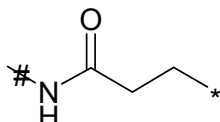
En una descripción, -D- es un elemento de la fórmula XIII: #NH-(CH2)t- (fórmula XIII), en la que preferentemente, t es 1, 2 o 3, con mayor preferencia t es 2.

En una descripción, -D- está ausente.

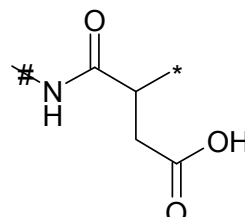
En una descripción, -E- es un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI o XXVII:



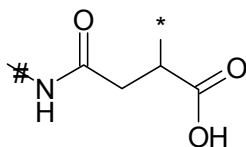
(fórmula XXII),



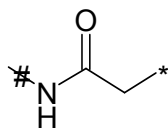
(fórmula XXIII),



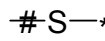
(fórmula XXV),



(fórmula XXVI),



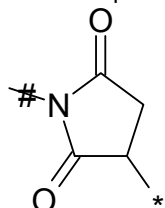
(fórmula XXIV)



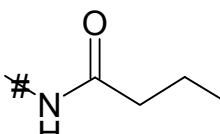
(fórmula XXVII) o un enlace.

5

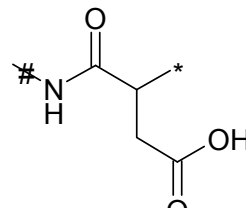
En una descripción, -E- es un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXV o XXVI:



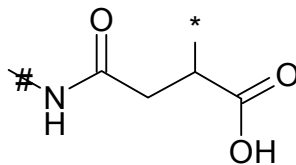
(fórmula XXII),



(fórmula XXIII),



(fórmula XXV),

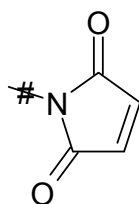


(fórmula XXVI), o un enlace.

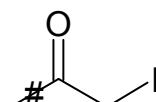
10

En una descripción, -E- es el producto de la reacción del compuesto del FGF21 con un éster activado, por ejemplo, pero sin limitarse a N-hidroxi succinimida (fórmula XIV), o un elemento reactivo de la fórmula XV, XVI, XVII, IXX, IXX, XX u XI:

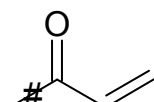
15



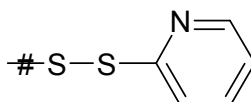
(fórmula XV),



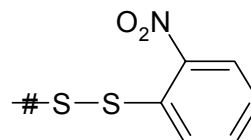
(fórmula XVI) o la amida de esta (yodoacetamida),



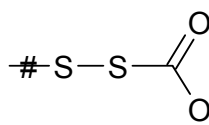
(fórmula XVII),



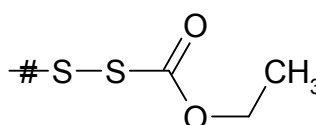
(fórmula IXX),



(fórmula IXX),



(fórmula XX), o



(fórmula XXI),

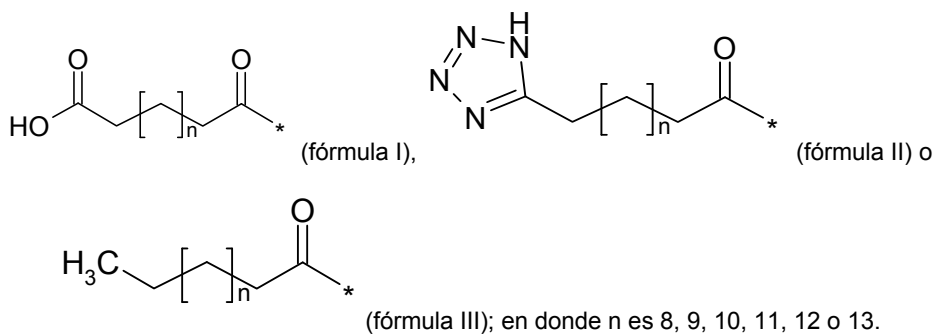
20

en donde # es el punto de unión a -C- o -D-.

En una descripción, el derivado tiene uno o dos aglutinantes de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E-.

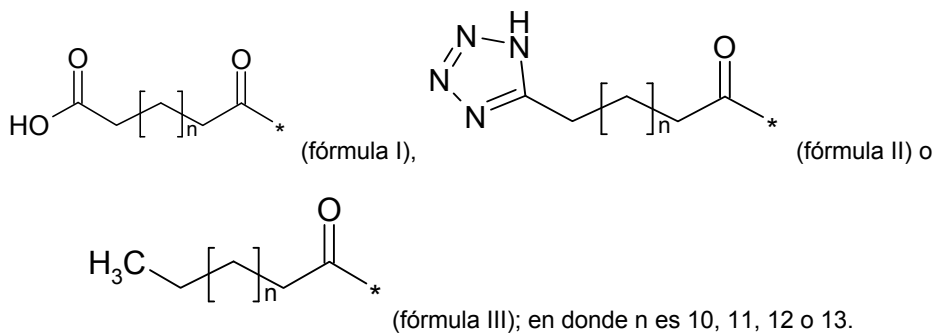
En una descripción, el derivado tiene dos aglutinantes de albúmina, preferentemente, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:

5



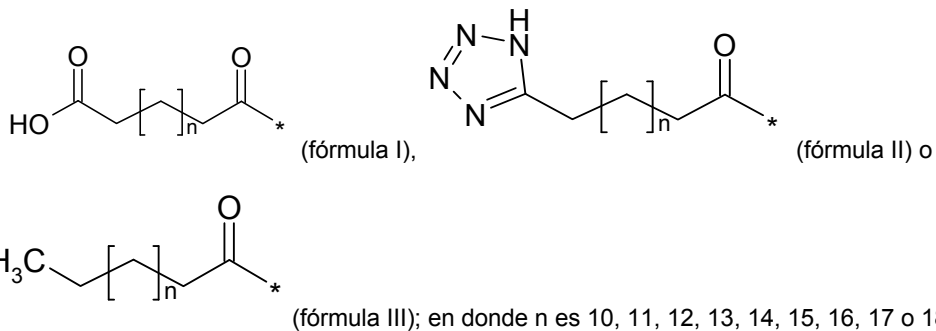
10

En una descripción, el derivado tiene dos aglutinantes de albúmina, preferentemente, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



15

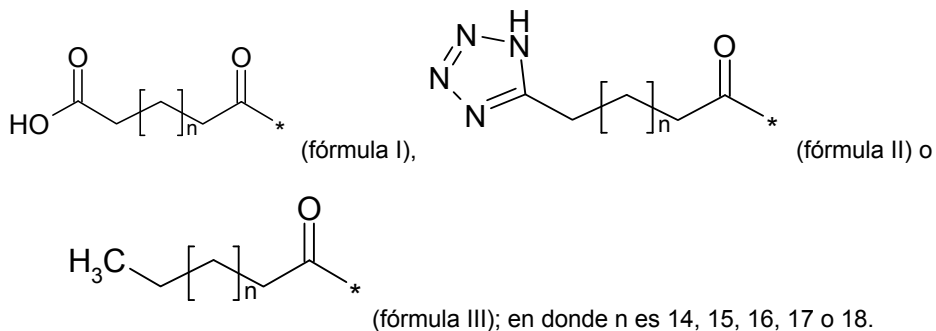
.En una descripción, el derivado tiene un aglutinante de albúmina, en el que preferentemente, A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



20

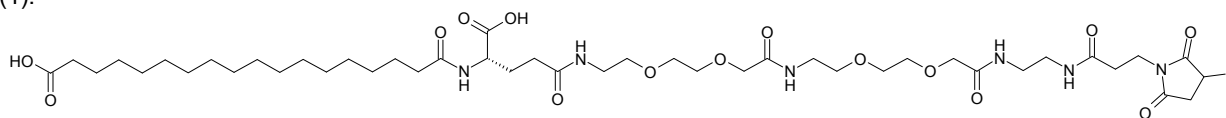
En una descripción, el derivado tiene un aglutinante de albúmina, en el que preferentemente, A- es un elemento de la fórmula I, II o III:

25



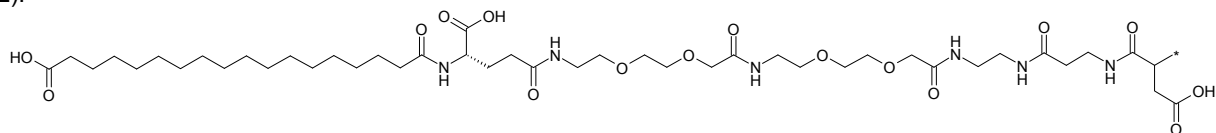
En una descripción, A-B-C-D-E- se selecciona a partir de las siguientes fórmulas (1)-(12):

(1):

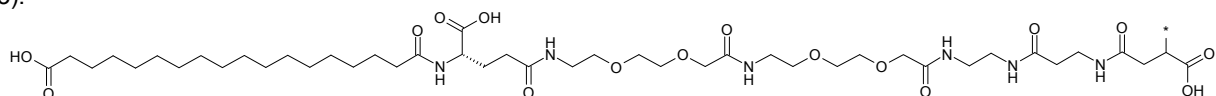


5

(2):

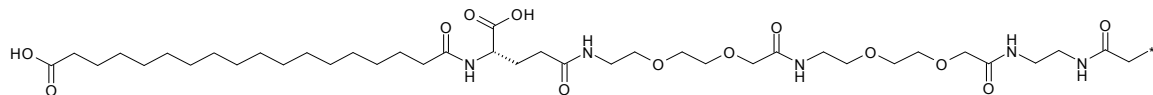


(3):



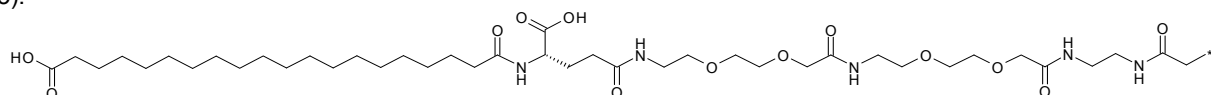
10

(4):

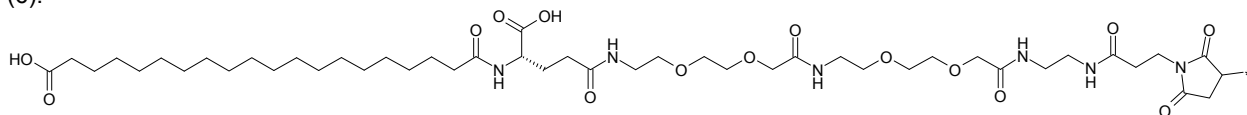


15

(5):

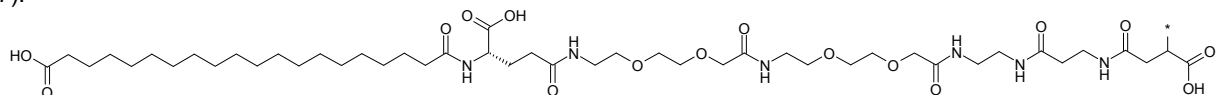


(6):



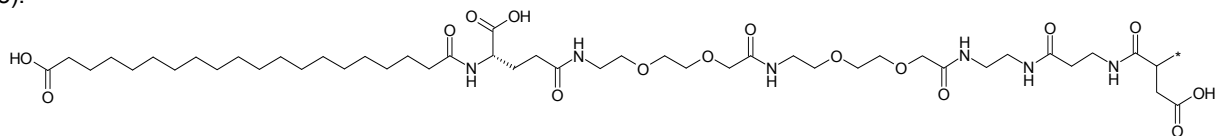
20

(7):

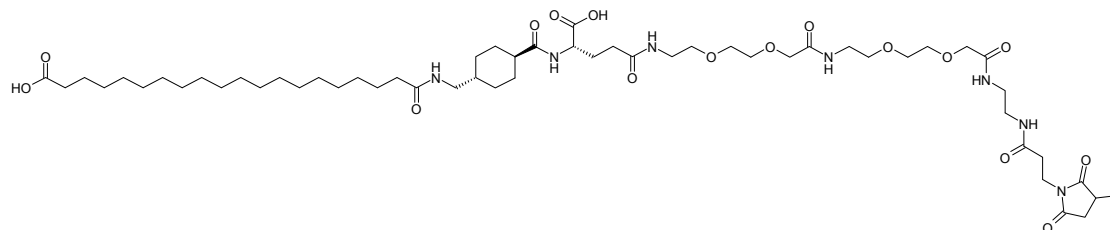


25

(8):

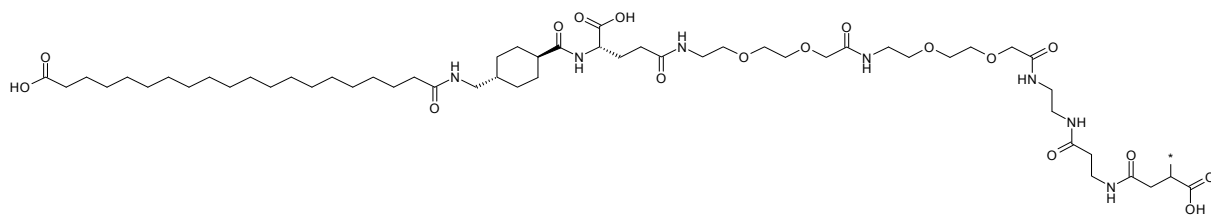


(9):

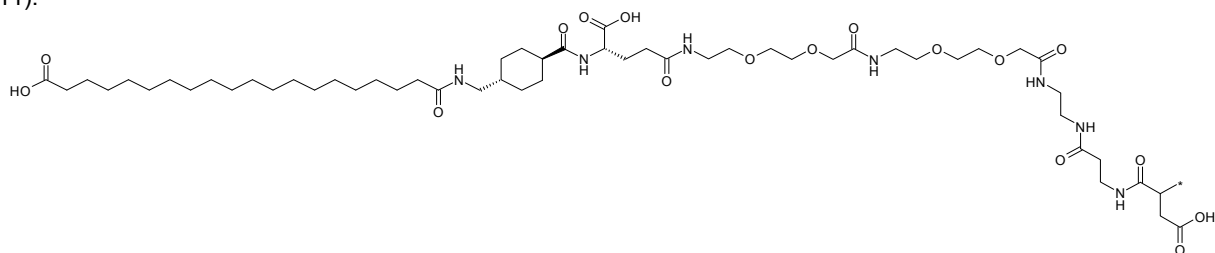


30

(10):

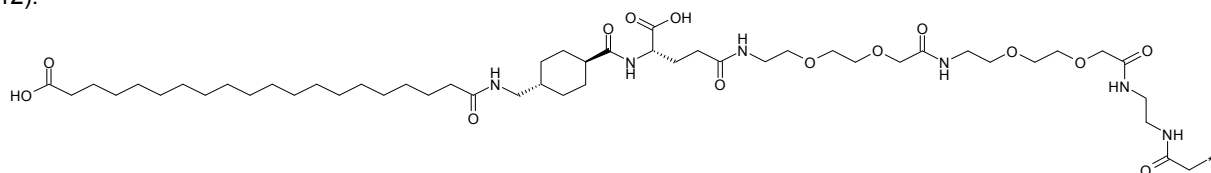


(11):

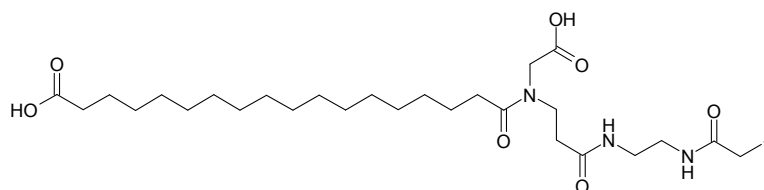


5

(12):

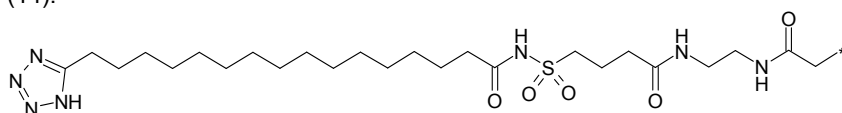


(13):



10

(14):



o las sales farmacéuticamente

aceptables de cualquiera de los derivados correspondientes. Los derivados que incluyen (2) y (3) pueden generarse por la vía de la degradación del derivado que incluye la fórmula (1).

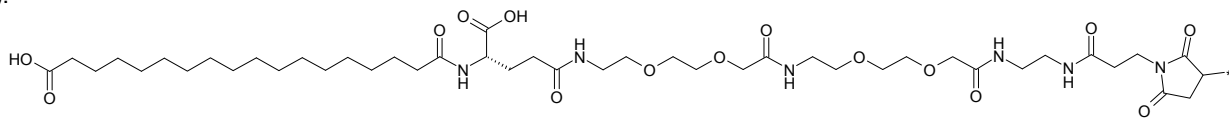
15

Las siguientes son modalidades particulares de los derivados de la invención, en las que un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- está unido covalentemente a un grupo tiol del compuesto del FGF21, es decir, por ejemplo, un residuo de cisteína:

20

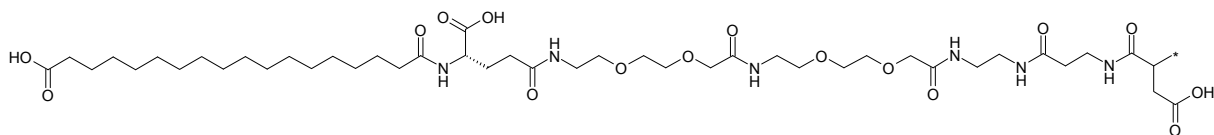
En una modalidad, A-B-C-D-E- se selecciona a partir de las siguientes fórmulas (1)-(8):

(1):

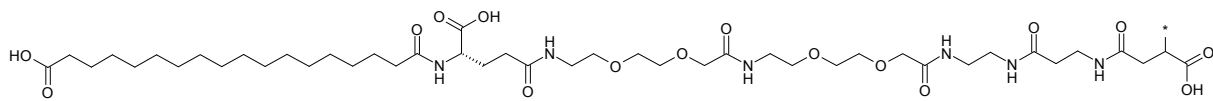


25

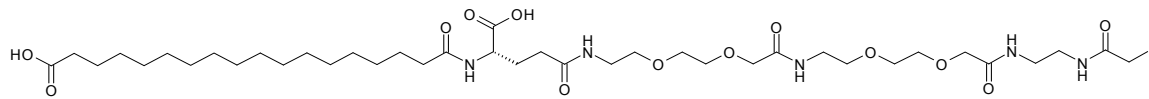
(2):



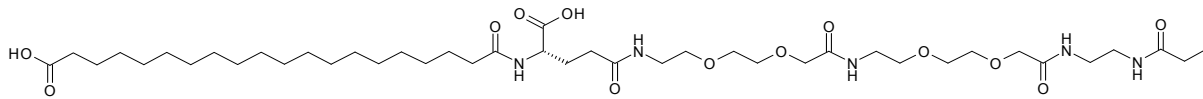
(3):



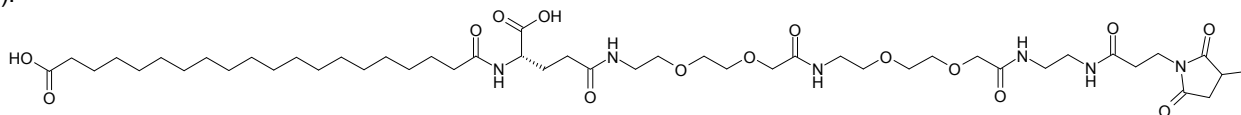
(4):



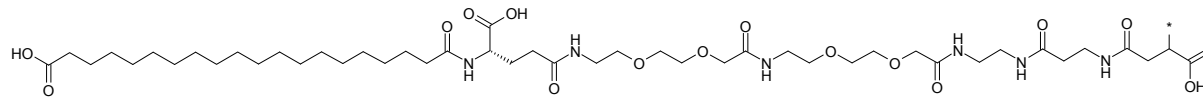
(5):



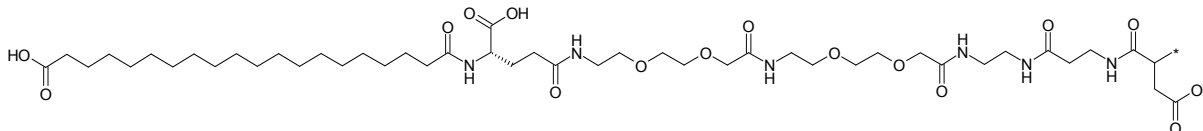
(6):



(7):



(8):



En una modalidad, el aglutinante de albúmina se une covalentemente a un residuo de cisteína en una o más posiciones (tal como dos) seleccionadas a partir de las posiciones -1 (por ejemplo, en el análogo MetCys-FGF21), 6, 71, y 122 del compuesto del FGF21, en donde la numeración de la posición es por referencia a la sec. con núm. de ident.:1.

En una modalidad, el compuesto de la invención se selecciona a partir de los derivados de los Ejemplos 4, 5 y 6, preferentemente, los siguientes: S-122-[1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-etil)-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys122]-Met-FGF21; S-71-[1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-etil)-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys71]Met-FGF21; y S-71-((2-{2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) [Cys71]Met-FGF21; o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos compuestos.

Las siguientes son modalidades particulares adicionales del derivado de la invención, tal como se caracteriza por la estructura del compuesto del FGF21 constitutivo:

Preferentemente, el compuesto del FGF21 tiene una identidad de al menos 80 %, con respecto a la sec. con núm. de ident.:1, preferentemente, al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 %.

Preferentemente, el compuesto del FGF21 tiene un máximo de 36 cambios de aminoácidos (modificaciones) en comparación con la sec. con núm. de ident.:1, preferentemente, un máximo de 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 cambio(s) de aminoácido(s); con mayor preferencia, un máximo de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 modificaciones de aminoácidos; incluso con mayor preferencia, un máximo de 9, 8, 7, 6 o 5 modificaciones de aminoácidos; o con la máxima preferencia, un máximo de 4, 3, 2 o 1 modificación(s) de aminoácido(s).

Preferentemente, el compuesto del FGF21 tiene una extensión del N-terminal de hasta 25 residuos de aminoácidos. Tales extensiones pueden referirse mediante el uso de números de residuos negativos, es decir números de residuos de -1 a -25 de la sec. con núm. de ident.:1. Esta extensión del N-terminal es un enlazador que se contempla para facilitar la unión de un aglutinante de albúmina, como se define y se reivindica en la presente descripción, para el N-terminal del compuesto del FGF21. Cuando se usa este enlazador, el derivado puede comprender solamente (o consistir en) el elemento A-, lo que significa que los elementos -B-, -C-, -D- y -E- pueden todos estar ausentes. Preferentemente, sin embargo, un elemento -B- y/o un elemento -C- se incluyen en adición a A-, con mayor preferencia, un elemento -B1- de Trx o Inp, o con la máxima preferencia un elemento -B2- de la fórmula IIX, IX o XXVII, en particular gamma-Glu. La extensión del N-terminal preferentemente, tiene hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia, hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos.

Preferentemente, al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son glicina o serina.

En una modalidad, el compuesto del FGF21 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1.

En una modalidad, el compuesto del FGF21 comprende (a) al menos una de las siguientes modificaciones en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: -1M, -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, L118C, K122C, K122R, A134C, I152K, L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, y/o S181K,R (preferentemente, al menos una de las siguientes: -1M, -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, L118C, K122C, K122R, A134C, I152K y/o M168L); y/o (b) una extensión en el N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son G o S.

En una modalidad, el compuesto del FGF21 comprende (a) las siguientes modificaciones, en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: (i) K122C, (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, M168L, (Y179F, A180E, S181R), (V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K), y/o (L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) (preferentemente, K122C, (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, y/o M168L), (ii) -1G, y (-1G, M168L), o (iii) S6C, (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R), y (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R), en donde el compuesto del FGF21 de (i) y (iii) pueden, además, opcionalmente, incluir una M en el N-terminal; y/o (b) una extensión en el N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 seleccionada a partir de las siguientes: (iv) MG-, MC-, MS-, MSGSGSGSGSG-, MGGGGG-, MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, MSGGGGG-, MSGSGGS-, MSGGSSG-, y MSGSGSG-, en donde la M en el N-terminal en cada uno de los compuestos del FGF21 de (iv) puede eliminarse, opcionalmente.

En una modalidad, el compuesto del FGF21 comprende Y179F, A180E y S181K o S181R (i); preferentemente, este comprende, adicionalmente, V169aT, P171L, S172E, Q173A y G174V (ii); con mayor preferencia este comprende, adicionalmente, L166F, S167G y M168L (iii); con la máxima preferencia este comprende (i), (ii) y (iii). Cada una de esas modalidades opcionalmente (i)-(iii) incluyen una M en el N-terminal (por ejemplo, -1M).

En una modalidad, el compuesto del FGF21 comprende las siguientes sustituciones en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: (a) K122C; (b) (K59R, K69R, K122R); (c) (K56R, K69R, K122R); (d) (K56R, K59R, K69R); (e) S71C; (f) S6C; (g) (K56R, K59R, K69R, K122R); (h) (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K); (i) (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R); (j) (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R); o (k) M168L.

En una modalidad, el compuesto del FGF21 comprende las siguientes modificaciones en comparación con el FGF21 (sec. con núm. de ident.:1): (i) Met-Gly- en el N-terminal, (ii) M168L, (iii) modalidad (i) y (ii), (iv) Met-Cys- en el N-terminal, (v) Gly- en el N-terminal, (vi) modalidad (v) y (ii), (vii) Met-Ser- en el N-terminal, o (viii) Ser- en el N-terminal; preferentemente, el compuesto del FGF21 se selecciona a partir de los siguientes: (l) Met-Gly-FGF21, (m) Met-Gly-FGF21-M168L, (n) Met-Cys-FGF21, (o) Gly-FGF21-M168L, (p) Gly-FGF21, (q) Met-Ser-FGF21, o (r) Ser-FGF21; en donde FGF21 se refiere al polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1.

En una modalidad, el compuesto del FGF21 comprende las siguientes extensiones en el N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: (q) MS-FGF21, (s) MSGSGSGSGSG-, (t) MGGGGG-, (u)

MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, (v) MSGGGG-, (x) MSGSGG-, (y) MSGGSSG-, y (z) MSGSGSG-; así como también cualquiera de las modalidades (q), (s), (t), (u), (v), (x), (y), y (z) sin la M en el N-terminal.

En una modalidad, el compuesto del FGF21 se selecciona a partir de las siguientes variantes del polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1: (a) K122C, (e) S71C, (f) S6C, (n) Met-Cys-FGF21, cualquiera de los compuestos (a), (e) y (f) con una Met en el N-terminal, y el compuesto (n) sin la Met en el N-terminal.

En una modalidad, el compuesto del FGF21 se selecciona a partir de las siguientes variantes del polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1: (b) (K59R, K69R, K122R); (c) (K56R, K69R, K122R); (d) (K56R, K59R, K69R); (g) (K56R, K59R, K69R, K122R); (h) (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K); (i) (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R); (j) (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R); (k) (179F, 180E, 181R); (l) (169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K); y (m) (166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K); así como también cualquiera de los compuestos (b), (c), (d), (g), (h), (i), (j), (k), (l) y (m) con una Met en el N-terminal (preferentemente, (b)-(j) +/- Met en el N-terminal).

En una modalidad, el compuesto del FGF21 tiene una prolina en la posición 146, en donde el número de la posición se refiere a la sec. con núm. de ident.:1, que es una forma alélica de tipo silvestre del FGF21 conocida de la técnica anterior.

Las siguientes son modalidades particulares adicionales del derivado de la invención, tal como se caracteriza por las propiedades biológicas y químicas:

En una modalidad, el derivado de esta invención es, preferentemente, prolongado, compárese con el Ejemplo 11 de la sección Experimental en la presente descripción.

En una modalidad, el derivado de esta invención tiene un T $\frac{1}{2}$ cuando se administra s.c. en ratones de al menos 1.5 horas, preferentemente al menos 2 horas, con mayor preferencia al menos 4 horas, incluso con mayor preferencia al menos 5 horas, o con la máxima preferencia al menos 6 horas.

En una modalidad, el derivado tiene un T $\frac{1}{2}$ cuando se administra s.c. en ratones de al menos 10 horas, preferentemente al menos 15 horas, con mayor preferencia al menos 24 horas, o con la máxima preferencia al menos 48 horas. Los ratones son ratones db/db, preferentemente, ratones que carecen del receptor de leptina.

En una modalidad, la dosificación del derivado es 0,5 mg/kg, aunque puede usarse, además, una dosificación en el intervalo de 0,1 a 1,0 mg/kg.

En otra modalidad, el derivado de esta invención tiene un T $\frac{1}{2}$ cuando se administra i.v. en mini cerdos de al menos 15 horas, preferentemente al menos 20 horas, con mayor preferencia al menos 30 horas, incluso con mayor preferencia al menos 40 horas, o con la máxima preferencia al menos 50 horas.

El derivado de esta invención puede incluso tener un T $\frac{1}{2}$ cuando se administra i.v. en mini cerdos de al menos 60 horas, preferentemente, de al menos 70 horas, con mayor preferencia de al menos 75 horas. Los mini cerdos son, preferentemente, mini cerdos Göttingen, machos normales. El número de cerdos en cada grupo de tratamiento es preferentemente n=3-4. Los cerdos son, preferentemente, de 12-15 meses de edad, y con mayor preferencia de un peso de aproximadamente 25 kg. Los cerdos son, preferentemente, administrados con una dosis única intravenosa de, preferentemente, 0,1 mg/kg (aproximadamente 5 nmol/kg).

La concentración en plasma de los derivados y análogos de la invención, así como también de los compuestos del FGF21 comparativos, pueden determinarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Un ensayo preferido es el ELISA del Factor de Crecimiento de Fibroblasto-21 Humano, comercializado por BioVendor con núm. de catálogo RD191108200R (por ejemplo, BioVendor GmbH, Im Neuenheimer Feld 583, D-69120 Heidelberg, Alemania).

El derivado, preferentemente, tiene una potencia aceptable, compárese con el Ejemplo 8 de la sección Experimental en la presente descripción.

En una modalidad, la potencia es al menos 1 %, preferentemente, al menos 5 %, con mayor preferencia al menos 10 %, incluso con mayor preferencia al menos 20 %, o con la máxima preferencia al menos 30 % de la potencia de Met-FGF21, en donde la potencia se determina mediante la medición de la captación de la glucosa en adipocitos 3T3-L1.

En una modalidad, la potencia es al menos 40 %, preferentemente, al menos 50 %, con mayor preferencia al menos 60 %, incluso con mayor preferencia al menos 70 %, en relación a la potencia del Met-FGF21.

En una modalidad, la potencia puede ser incluso al menos 80 %, preferentemente, al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 100 %, incluso con mayor preferencia al menos 110 %, o con la máxima preferencia al menos 120 %, en relación a la potencia del Met-FGF21.

Para cada una de esas modalidades la potencia se determina, preferentemente, mediante la medición de la captación de la glucosa en adipocitos 3T3-L1.

La potencia se calcula como la EC_{50} del derivado en relación a la EC_{50} del Met-FGF21.

Los adipocitos 3T3-L1 se derivan de fibroblastos murinos 3T3-L1, preferentemente, ATCC CL-173.

La captación de la glucosa en los adipocitos 3T3-L1 puede medirse como se describe en el Ejemplo 8.

El derivado de esta invención tiene, preferentemente, una potencia aceptable y una vida media prolongada:

En una modalidad, el derivado de esta invención tiene un $T_{1/2}$ cuando se administra s.c. en ratones de al menos 1,5 horas, preferentemente, al menos 2 horas, con mayor preferencia al menos 4 horas, incluso con mayor preferencia al menos 5 horas, o con la máxima preferencia al menos 6 horas – y al mismo tiempo una potencia como se describe en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, el derivado de esta invención tiene un $T_{1/2}$ cuando se administra s.c. en ratones de al menos 10 horas, preferentemente, al menos 15 horas, con mayor preferencia al menos 24 horas, o con la máxima preferencia al menos 48 horas – y al mismo tiempo una potencia como se describe en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, el derivado de esta invención tiene un $T_{1/2}$ cuando se administra i.v. en mini cerdos de al menos 15 horas, preferentemente, al menos 20 horas, con mayor preferencia al menos 30 horas, incluso con mayor preferencia al menos 40 horas, o con la máxima preferencia al menos 50 horas – y al mismo tiempo una potencia como se describe en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, el derivado tiene un $T_{1/2}$ cuando se administra i.v. en mini cerdos de al menos 60 horas, preferentemente, de al menos 70 horas, con mayor preferencia de al menos 75 horas – y al mismo tiempo una potencia como se describe en cualquiera de las modalidades anteriores.

El derivado tiene efecto in vivo sobre el nivel de glucosa en sangre de los ratones db/db, compárese con el Ejemplo 11 de la sección Experimental en la presente descripción:

El derivado es capaz de disminuir la glucosa en sangre in vivo en ratones db/db en relación a un control de vehículo.

En una modalidad, el valor de glucosa en sangre se disminuye en 24 horas, preferentemente, 48 horas, después que se ha administrado una última dosis del derivado.

En una modalidad, el valor de glucosa en sangre se disminuye en al menos 10 %, preferentemente en al menos 15 %, con mayor preferencia en al menos 20 %, incluso con mayor preferencia en al menos 25 %, o con la máxima preferencia en al menos 30 %, en base a la media de la glucosa en sangre medida en mM y en relación al control de vehículo correspondiente. Como un ejemplo, por referencia a los datos de la Tabla 3: 48 horas después de la última dosis, el derivado del Ejemplo 4, administrado a 0,22 mg/kg, proporciona un aumento en el nivel medio de glucosa en sangre de 17,1 mM. En el mismo período de tiempo, el vehículo proporciona un aumento en el nivel medio de glucosa en sangre de 23,9 mM. En consecuencia, el derivado del Ejemplo 4, administrado a 0,22 mg/kg, proporciona un descenso o disminución del 100 % de la glucosa en sangre - $(100 \times 17,1 / 23,9) \% = 28 \%$, en comparación con el control de vehículo.

En una modalidad, el valor de glucosa en sangre se disminuye en al menos 35 %, preferentemente en al menos 40 %, con mayor preferencia en al menos 45 %, o con la máxima preferencia en al menos 50 %, ver el método de evaluación en el ejemplo 10.

Los derivados de la invención son preferentemente, estables a la oxidación, como referencia el Ejemplo 9 de la presente descripción.

En una modalidad, el derivado de esta invención es más estable que Met-FGF21 hacia la oxidación. Esto puede evaluarse mediante el almacenamiento a varias temperaturas y el control de la oxidación, o mediante la incubación en presencia de 300 mM H_2O_2 durante 1 hora a 25 °C.

El término "estable", es decir, la estabilidad, se refiere a la potencia, determinada como se describe anteriormente.

Después de la incubación con H_2O_2 el derivado tiene una potencia de al menos 15 %, preferentemente al menos 20 %, con mayor preferencia al menos 30 %, incluso con mayor preferencia al menos 40 %, o con la máxima preferencia al menos 50 %, en donde la potencia es relativa al Met-FGF21 tratado de la misma manera, pero entonces sin H_2O_2 .

Las siguientes son modalidades particulares de los análogos de FGF21 de la invención, primeramente definidos por la estructura, posteriormente por las propiedades biológicas y químicas, y finalmente algunas modalidades estructurales adicionales:

5 Una modalidad es un análogo del FGF21 que comprende (a) al menos una de las siguientes modificaciones en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, K122R, I152K, L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, y/o S181K,R (preferentemente, -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, K122R, I152K, y/o M168L); y/o (b) una extensión del N-terminal con respecto a la sec. con núm. de
10 ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son G o S.

15 Una modalidad es un análogo del FGF21, que comprende (a) las siguientes modificaciones, con respecto a la sec. con núm. de ident.:1: (i) (K122C), (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, M168L, (Y179F, A180E, S181R), (V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K), o (L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) (preferentemente, (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), y/o (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, y/o M168L), (ii) -1G, y (-1G, M168L), o (iii) S6C, (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R), y (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R), en donde el análogo del FGF21 de (i) y (iii) puede, además,
20 opcionalmente, incluir una M en el N-terminal; y/o (b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 seleccionada a partir de los siguientes: (iv) MG-, MC-, MS-, MSGSGSGSGSG-, MGGGGG-, MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, MSGGGGG-, MSGSGGS-, MSGGSSG-, y MSGSGSG-, en donde la M del N-terminal de cada uno de los análogos del FGF21 de (iv) puede eliminarse, opcionalmente.

30 Una modalidad es un análogo del FGF21, que comprende (a) las siguientes modificaciones, con respecto a la sec. con núm. de ident.:1: (i) (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, M168L, (Y179F, A180E, S181R), (V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K), o (L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) (preferentemente, (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), y/o (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, y/o M168L), (ii) -1G, y (-1G, M168L), o (iii) S6C, (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R), y (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R), en donde el análogo del FGF21 de (i) y (iii) puede, además,
35 opcionalmente, incluir una M en el N-terminal; y/o (b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 seleccionada a partir de los siguientes: (iv) MG-, MC-, MS-, MSGSGSGSGSG-, MGGGGG-, MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, MSGGGGG-, MSGSGGS-, MSGGSSG-, y MSGSGSG-, en donde la M del N-terminal de cada uno de los análogos del FGF21 de (iv) puede eliminarse, opcionalmente.

40 Una modalidad es un análogo del FGF21 que comprende una o más de las siguientes modificaciones, en comparación con el polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1: S6C, S6K, K56R, K59R, K69R, S71C, K122R, I152K, L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, y/o S181K,R (preferentemente, S6C, S6K, K56R, K59R, K69R, S71C, K122R, I152K, y/o M168L). Esta modalidad incluye sustituciones únicas
45 novedosas en la porción del FGF21 maduro, en orden numérico.

Una modalidad es un análogo del FGF21 que comprende una o más de las siguientes modificaciones, en comparación con el polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1: S6C, S71C, M168L, (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), (K56R, K69R, K122R), (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), y (K56R, K59R, K69R, K122R, L118C-A134C), (L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K), (V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K), y/o (Y179F, A180E, S181R); preferentemente: S6C, S71C, M168L, (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), (K56R, K69R, K122R), (K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), y/o (K56R, K59R, K69R, K122R, L118C-A134C). Esta modalidad incluye análogos novedosos
50 de la invención con sus constituyentes sustituciones únicas y múltiples o combinadas en la porción madura del FGF21. Las sustituciones únicas se enumeran primero, después las combinadas en orden numérico después de la primera sustitución, posteriormente después un número incrementado de sustituciones.

60 Una modalidad es un análogo del FGF21 que comprende Y179F, A180E y S181K o S181R (i); preferentemente, que comprende adicionalmente V169aT, P171L, S172E, Q173A y G174V (ii); con mayor preferencia que comprende adicionalmente L166F, S167G y M168L (iii); con la máxima preferencia que comprende (i), (ii) y (iii).

En una modalidad, el análogo del FGF21 de cualquiera de las modalidades anteriores puede incluir, además, una
65 Met en la posición -1 de la sec. con núm. de ident.:1.

Una modalidad es un análogo del FGF21 seleccionado a partir de los siguientes: (l) Met-Gly-FGF21, (m) Met-Gly-FGF21-M168L, (n) Met-Cys-FGF21, (o) Gly-FGF21-M168L, (p) Gly-FGF21, (q) Met-Ser-FGF21, o (r) Ser-FGF21; en donde FGF21 designa el polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1.

Una modalidad es un análogo del FGF21 que tiene una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son glicina o serina.

Una modalidad es un análogo del FGF21 que comprende las siguientes extensiones del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: (q) MS-FGF21, (s) MSGSGSGSGSG-, (t) MGGGGG-, (u) MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, (v) MSGGGGG-, (x) MSGSGGS-, (y) MSGGSSG-, y (z) MSGSGSG-; así como también cualquiera de las modalidades (q), (s), (t), (u), (v), (x), (y), y (z) sin la M en el N-terminal.

Una modalidad es un análogo del FGF21 que se selecciona a partir de los siguientes: (r) MSGSGSGSGSG-FGF21, (s) MGGGGG-FGF21, (t) MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-FGF21, (u) MSGGGGG-FGF21, (v) MSGSGGS-FGF21, (x) MSGGSSG-FGF21, y (y) MSGSGSG-FGF21, así como también cualquiera de las modalidades (r), (s), (t), (u), (v), (x) e (y) sin la Met del N-terminal; en donde FGF21 se refiere a la sec. con núm. de ident.:1.

Una modalidad es el análogo del FGF21 de cualquiera de las modalidades anteriores que tiene una P (prolina) en la posición 146, en donde el número de la posición se refiere a la sec. con núm. de ident.:1.

En una modalidad, el análogo del FGF21 tiene una potencia de al menos 1 % en comparación con la potencia del Met-FGF21, en donde la potencia se determina mediante la medición de la captación de la glucosa en adipocitos 3T3-L1.

En una modalidad, el análogo del FGF21 tiene una potencia de al menos 5 %, preferentemente, al menos 10 %, con mayor preferencia al menos 20 %, incluso con mayor preferencia al menos 30 %, o con la máxima preferencia al menos 40 %, relativa a la potencia del Met-FGF21.

En una modalidad, el análogo del FGF21 tiene una potencia de al menos 50%, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 %, relativa a la potencia del Met-FGF21.

En una modalidad, el análogo del FGF21 tiene una potencia de al menos 100 %, preferentemente, al menos 120 %, con mayor preferencia al menos 140 %, incluso con mayor preferencia al menos 160 %, o con la máxima preferencia al menos 180 %, relativa a la potencia del Met-FGF21.

En una modalidad, el análogo del FGF21 tiene una potencia de al menos 200 %, preferentemente, al menos 250 %, con mayor preferencia al menos 300 %, incluso con mayor preferencia al menos 350 %, o con la máxima preferencia al menos 400 %, relativa a la potencia del Met-FGF21.

La potencia se determina como se describe para los derivados del FGF21, anteriormente.

Los análogos del FGF21 de esta invención son capaces de disminuir la glucosa en sangre en ratones db/db relativa a un control de vehículo.

En una modalidad, la glucosa en sangre se disminuye en al menos 1 %, preferentemente, en al menos 2 %, con mayor preferencia en al menos 3 %, incluso con mayor preferencia en al menos 4 %, o con la máxima preferencia en al menos 5 %, en base a la media de la glucosa en sangre medida en mM y relativa al control de vehículo correspondiente, ver el método de evaluación en el ejemplo 10.

El término "estable" o estabilidad se refiere a la potencia, determinada como se describió anteriormente.

En una modalidad, la potencia del análogo de esta invención después de la incubación con H₂O₂ es al menos 15 %, preferentemente, al menos 20 %, con mayor preferencia al menos 30 %, incluso con mayor preferencia al menos 40 %, o con la máxima preferencia al menos 50 %, en donde la potencia es relativa al Met-FGF21 tratado de la misma manera, pero entonces sin H₂O₂.

Estos análogos son preferidos por ser estables a la oxidación:

En una modalidad, los análogos comprenden las siguientes modificaciones en comparación con el FGF21 (sec. con núm. de ident.:1): (i) Met-Gly- en el N-terminal, (ii) M168L, (iii) modalidad (i) y (ii), (iv) Met-Cys- en el N-terminal, (v) Gly- en el N-terminal, (vi) modalidad (v) y (ii), (vii) Met-Ser- en el N-terminal, o (viii) Ser- en el N-terminal; preferentemente, el análogo del FGF21 se selecciona a partir de los siguientes: (l) Met-Gly-FGF21, (m) Met-Gly-FGF21-M168L, (n) Met-Cys-FGF21, (o) Gly-FGF21-M168L, (p) Gly-FGF21, (q) Met-Ser-FGF21, o (r) Ser-FGF21; en donde FGF21 se refiere al polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1 – si se desea con un a P (prolina) en la posición 146.

Los compuestos del FGF21, que incluyen los análogos del FGF21, y los derivados de los compuestos del FGF21 pueden prepararse de manera análoga como se describe para compuestos similares. Más específicamente, la referencia se hace para los ejemplos de trabajos específicos más abajo.

Los ejemplos 1 y 2 más abajo describen la clonación y la expresión del FGF21 y los análogos del FGF21 en *E. coli*. Alternativamente, el FGF21 y los análogos del FGF21, opcionalmente con extensiones en el N-terminal, pueden expresarse en levaduras como sigue:

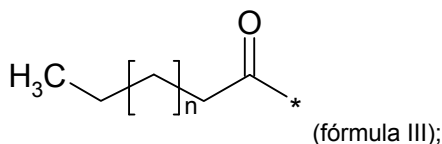
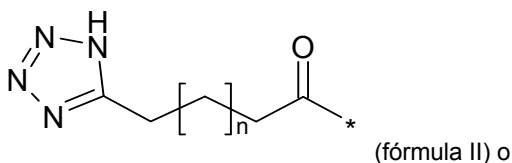
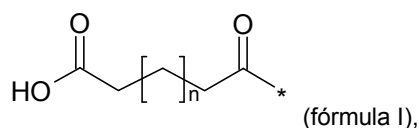
El FGF21 con extensiones de aminoácidos en el N-terminal pueden expresarse en *S. cerevisiae*. En una modalidad, esto requiere un diseño de cepa en el que se crea una cepa interrumpida en PMT2, PEP4 y YPS1. Esta cepa puede diseñarse mediante el uso de técnicas clásicas que se basan en la recombinación de homólogos, que permiten la integración específica en los loci respectivos. El FGF21 con extensión en el N-terminal es codificado en un vector de expresión para *S. cerevisiae* que puede mantenerse en *S. cerevisiae*. Para dirigir el análogo del FGF21 a la vía secretora, puede proporcionarse una secuencia pre-pro que incluye un péptido señal (por ejemplo, la secuencia líder pre-pro de MFalfa) en el vector de expresión recombinante. Esta secuencia está unida al ADN que codifica el análogo del FGF21 en el marco de lectura correcto. Este péptido señal asegura la secreción hacia el medio. Aguas arriba y adyacente a la secuencia del análogo del FGF21 se ubica una secuencia de aminoácidos dibásicos que asegura la escisión de la secuencia pre-pro del análogo del FGF21 antes de la secreción hacia el medio. La escisión probablemente sea causada por la actividad KEX2. El análogo del FGF21 puede recolectarse del medio.

Los derivados de un compuesto del FGF y los análogos del FGF21, si se desea, pueden formularse junto con otros medicamentos tales como la insulina.

Descripciones particulares adicionales

1. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente, en donde

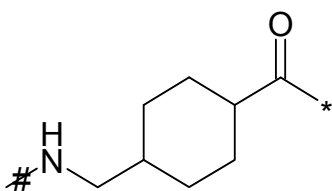
A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



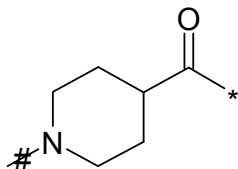
en donde n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19, y * es el punto de unión a -B-;

-B- está ausente, representa un enlace o se selecciona a partir de -B1-, -B2- o sus combinaciones, en donde

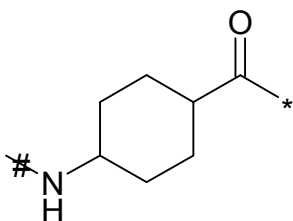
-B1- es un elemento de la fórmula IV, V, VI o VII:



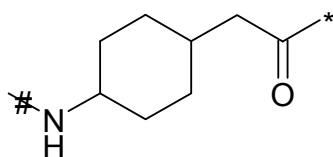
(fórmula IV o Trx),



(fórmula V o Inp),



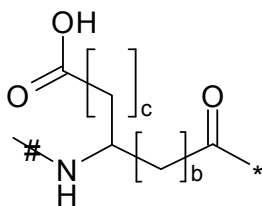
(fórmula VI) o



(fórmula VII);

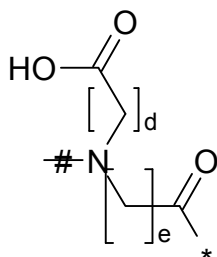
en donde * es el punto de unión a -B2- o -C-, y # es el punto de unión a A- o -B2-; y

-B2- es un elemento de la fórmula IIX o IX o una combinación de hasta cuatro elementos de la fórmula IIX y/o fórmula IX:



(fórmula IIX),

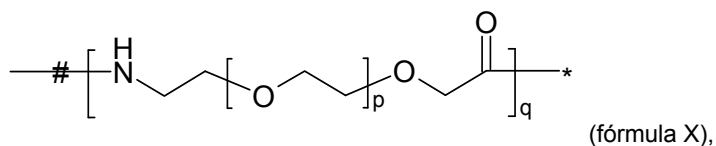
en donde b es 0, 1 o 2, c es 0, 1 o 2, con la condición de que b es 1 o 2 cuando c es 0, y b es 0 cuando c es 1 o 2, * es el punto de unión a -C-, -B1- u otro -B2-, y # es el punto de unión a A-, -B1- u otro -B2-, o



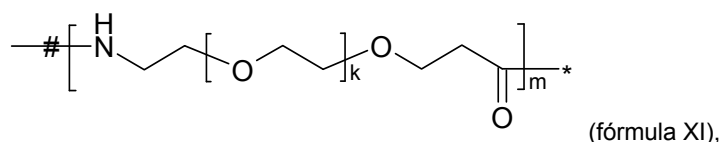
(fórmula IX),

en donde d es 1 o 2, e es 0, 1 o 2, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-;

-C- está ausente, representa un enlace o es un elemento de la fórmula X o XI:



5 en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, q es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -B-; o



10 en donde k es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 o 23, m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21; y # es el punto de unión a -B-;

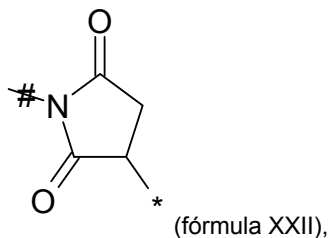
-D- está ausente, representa un enlace o es un elemento de la fórmula XII o XIII:

15 #NH-(CH₂)_r-NH-CO-(CH₂)_s- (fórmula XII) o

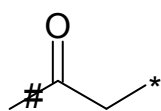
#NH-(CH₂)_t- (fórmula XIII),

20 en donde r es 2, 3, 4 o 5, s es 1, 2, 3 o 4, t es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -C-;

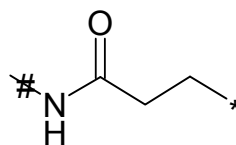
-E- es ausente, representa un enlace o un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIIIa, XXIV, XXIVa, XXV, XXVI o XXVII:



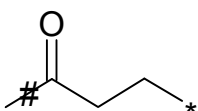
25



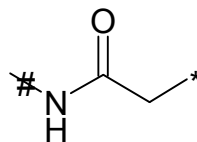
(fórmula XXIIIa) o



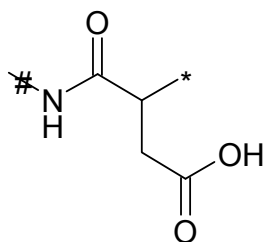
(fórmula XXIII),



(fórmula XXIVa) o

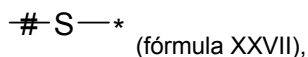
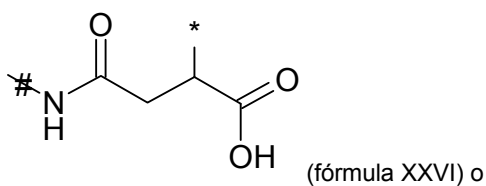


(fórmula XXIV),



(fórmula XXV),

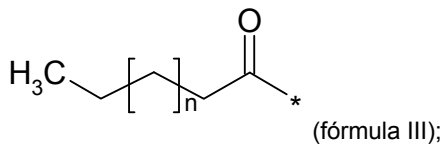
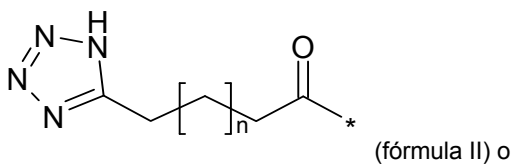
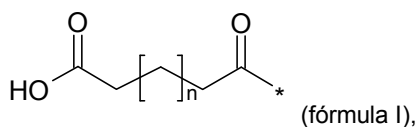
30



5 en donde * es el punto de unión al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -D- o -C-;
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

10 2. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente, en donde

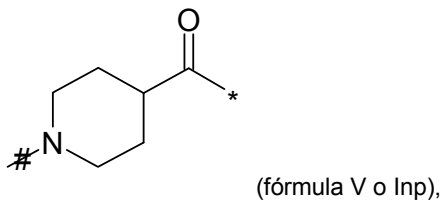
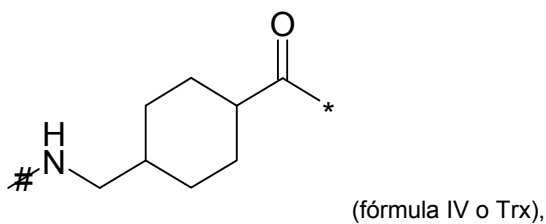
A- es un elemento de la fórmula I, II o III:

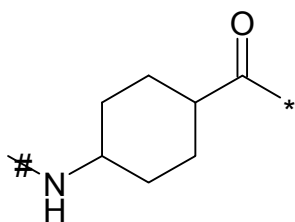


20 en donde n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19, y * es el punto de unión a -B-;

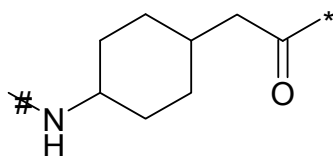
-B- está ausente, representa un enlace o se selecciona a partir de -B1-, -B2- o sus combinaciones, en donde

-B1- es un elemento de la fórmula IV, V, VI o VII:





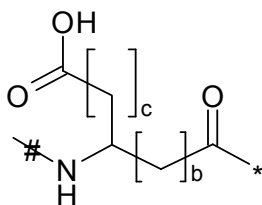
(fórmula VI) o



(fórmula VII);

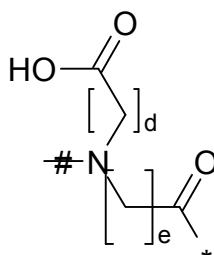
5 en donde * es el punto de unión a -B2- o -C-, y # es el punto de unión a A- o -B2-; y

-B2- es un elemento de la fórmula IIX o IX o una combinación de hasta cuatro elementos de la fórmula IIX y/o fórmula IX y/o fórmula XXVII:



(fórmula IIX),

10 en donde b es 0, 1 o 2, c es 0, 1 o 2, con la condición de que b es 1 o 2 cuando c es 0, y b es 0 cuando c es 1 o 2, * es el punto de unión a -C-, -B1- u otro -B2-, y # es el punto de unión a A-, -B1- u otro -B2-, o



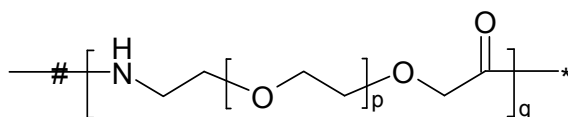
(fórmula IX),

15 en donde d es 1 o 2, e es 0, 1 o 2, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1- o



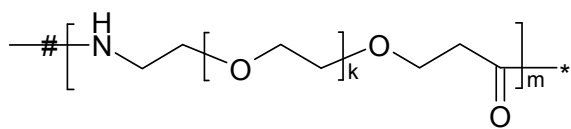
20 en donde u es 2, 3 o 4, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-;

-C- está ausente, representa un enlace o es un elemento de la fórmula X o XI:



(fórmula X),

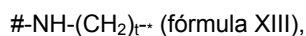
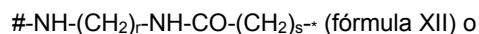
25 en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, q es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -B-; o



(fórmula XI),

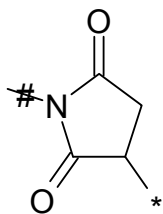
en donde k es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 o 23, m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21; y # es el punto de unión a -B-;

-D- está ausente, representa un enlace o es un elemento de la fórmula XII o XIII:

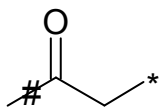


en donde r es 2, 3, 4 o 5, s es 1, 2, 3 o 4, t es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -C-;

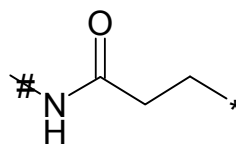
-E- es ausente, representa un enlace o un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIIIa, XXIV, XXIVa, XXV, XXVI o XXVII:



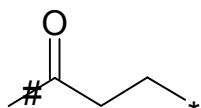
(fórmula XXII),



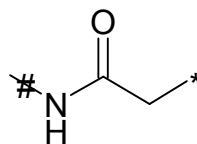
(fórmula XXIIIa) o



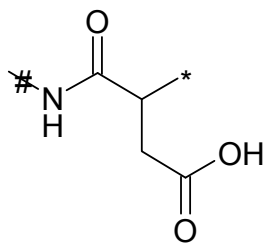
(fórmula XXIII),



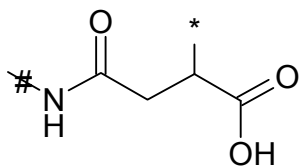
(fórmula XXIVa) o



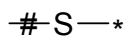
(fórmula XXIV),



(fórmula XXV),



(fórmula XXVI) o



(fórmula XXVIII),

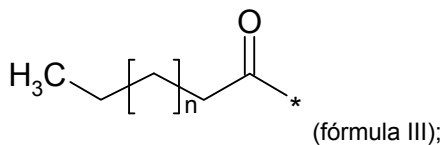
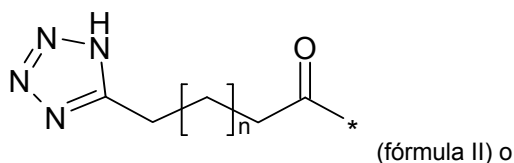
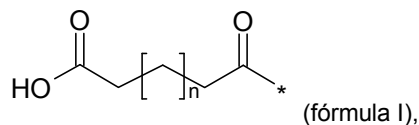
en donde * es el punto de unión al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -D- o -C-;
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

3. El derivado de las modalidades 1 o 2, en donde si A es un elemento de la fórmula (III), entonces al menos uno de -B-, -C-, -D- y -E- está presente y/o no representa un enlace.

4. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde -B- y -C- están presentes y no representan un enlace.

5. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde

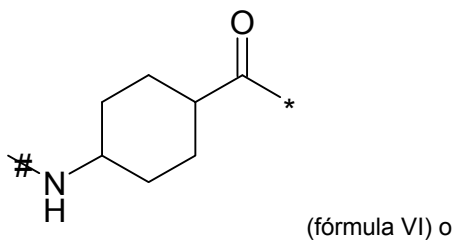
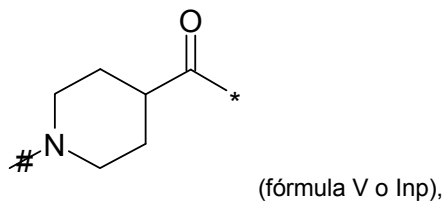
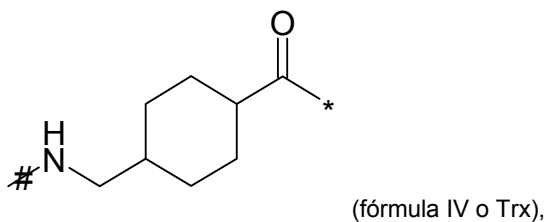
A- es un elemento de la fórmula I, II o III:

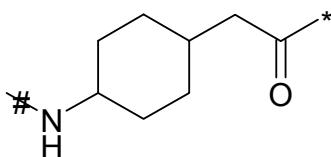


en donde n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19, y * es el punto de unión a -B-;

-B- es -B1-, -B2- o sus combinaciones, en donde

-B1- es un elemento de la fórmula IV, V, VI o VII:

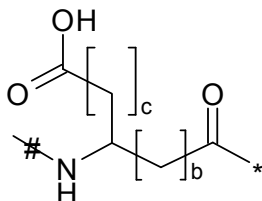




(fórmula VII);

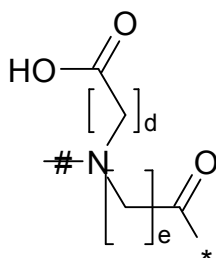
en donde * es el punto de unión a -B2- o -C-, y # es el punto de unión a A- o -B2-; y

- 5 -B2- es un elemento de la fórmula IIX, IX o XXVIII o una combinación de hasta cuatro elementos de la fórmula IIX y/o la fórmula IX y/o la fórmula XXVIII:



(fórmula IIX),

- 10 en donde b es 0, 1 o 2, c es 0, 1 o 2, con la condición de que b es 1 o 2 cuando c es 0, y b es 0 cuando c es 1 o 2, * es el punto de unión a -C-, -B1- u otro -B2-, y # es el punto de unión a A-, -B1- u otro -B2-,



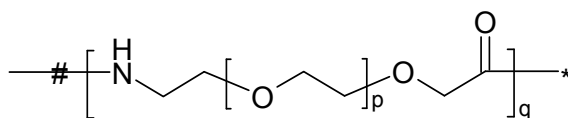
(fórmula IX),

- 15 en donde d es 1 o 2, e es 0, 1 o 2, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-; o



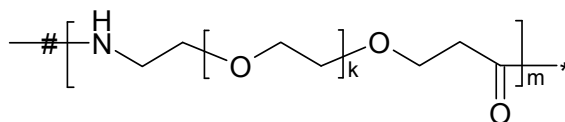
en donde u es 2, 3 o 4, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-;

- 20 -C- es un elemento de la fórmula X o XI:



(fórmula X),

- 25 en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, q es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -B-; o



(fórmula XI),

- 30 en donde k es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 o 23, m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21; y # es el punto de unión a -B-;

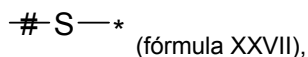
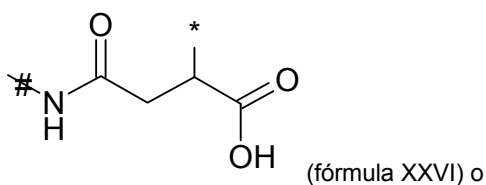
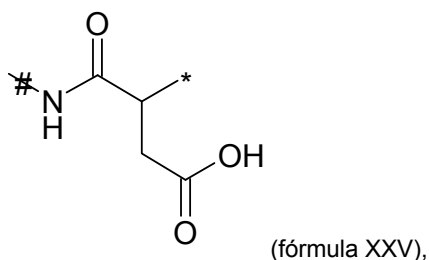
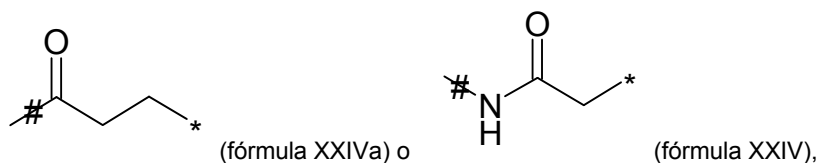
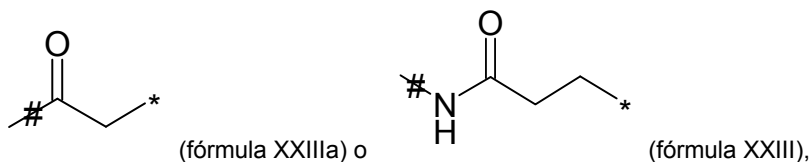
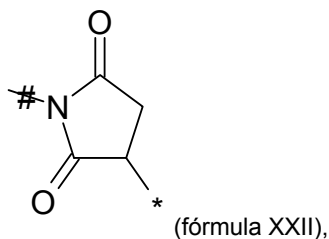
-D- es opcional, y cuando presenta un elemento de la fórmula XII o XIII:

#-NH-(CH₂)_r-NH-CO-(CH₂)_s-* (fórmula XII) o

#-NH-(CH₂)_t-* (fórmula XIII),

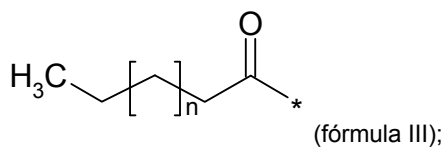
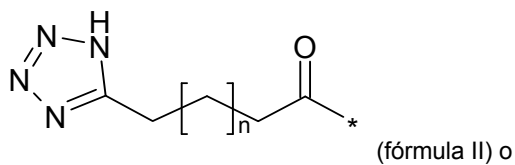
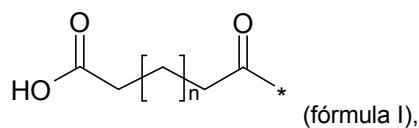
5 en donde r es 2, 3, 4 o 5, s es 1, 2, 3 o 4, t es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -C-;

-E- es opcional, y cuando presenta un enlace o un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIIIa, XXIV, XXIVa, XXV, XXVI o XXVII:



en donde * es el punto de unión al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -D- o -C-; o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

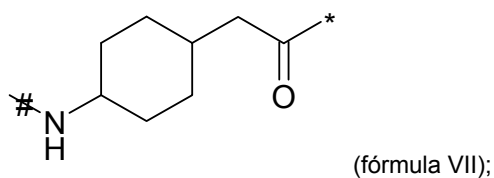
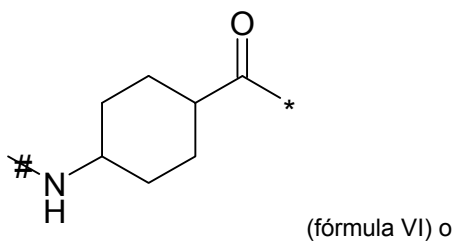
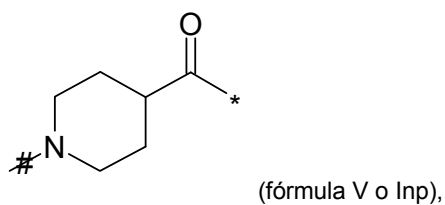
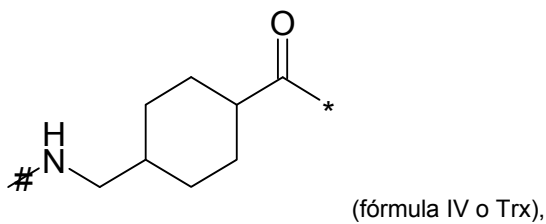
6. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



en donde n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19, y * es el punto de unión a -B-;

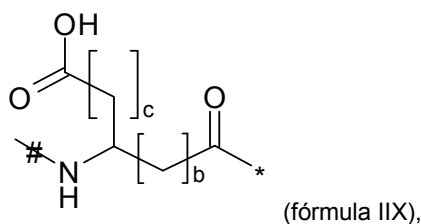
-B- es -B1-, -B2- o sus combinaciones, en donde

-B1- es un elemento de la fórmula IV, V, VI o VII:



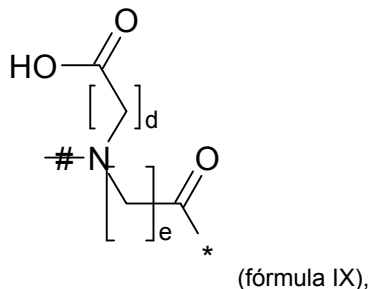
en donde * es el punto de unión a -B2- o -C-, y # es el punto de unión a A- o -B2-; y

-B2- es un elemento de la fórmula IIX o IX o una combinación de hasta cuatro elementos de la fórmula IIX y/o fórmula IX:



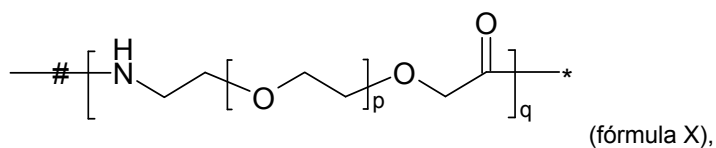
en donde b es 0, 1 o 2, c es 0, 1 o 2, con la condición de que b es 1 o 2 cuando c es 0, y b es 0 cuando c es 1 o 2, * es el punto de unión a -C-, -B1- u otro -B2-, y # es el punto de unión a A-, -B1- u otro -B2- o

5

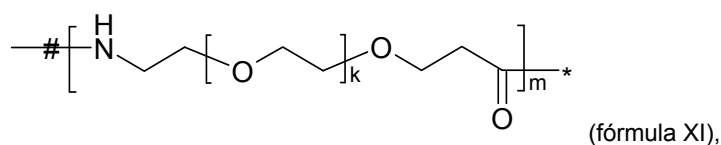


en donde d es 1 o 2, e es 0, 1 o 2, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-;

10 -C- es un elemento de la fórmula X o XI:

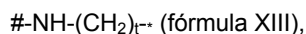
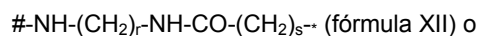


15 en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, q es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -B-; o



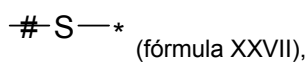
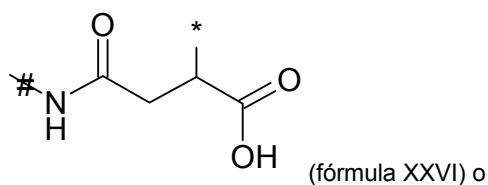
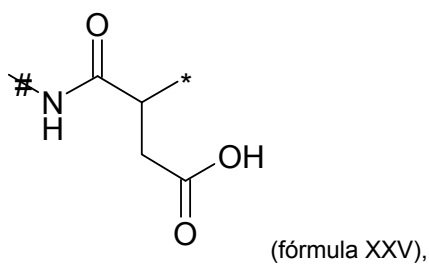
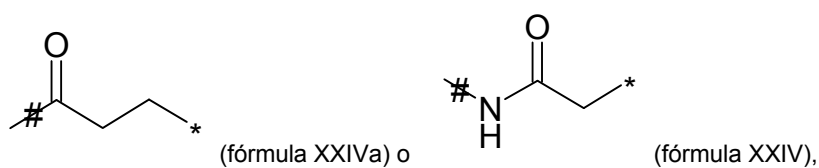
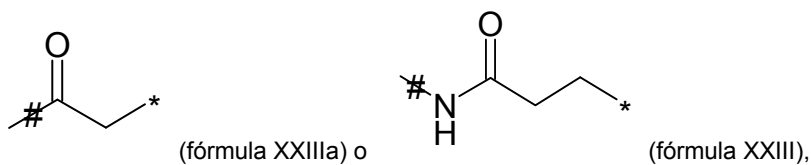
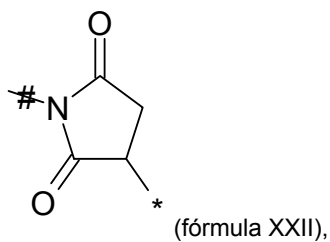
20 en donde k es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 o 23, m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21; y # es el punto de unión a -B-;

-D- es opcional, y cuando presenta un elemento de la fórmula XII o XIII:



en donde r es 2, 3, 4 o 5, s es 1, 2, 3 o 4, t es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -C-;

-E- es opcional, y cuando presenta un enlace o un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIIIa, XXIV, XXIVa, XXV, XXVI o XXVII:

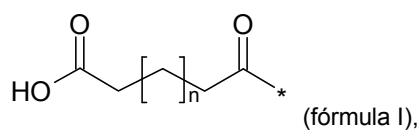


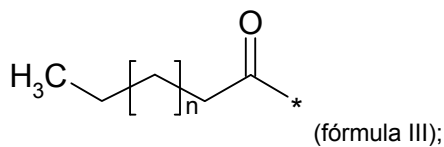
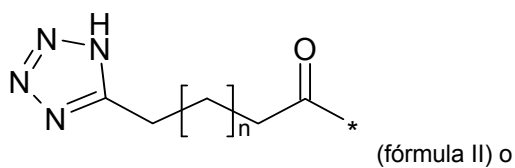
en donde * es el punto de unión al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -D- o -C-;

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

7. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente a un grupo tiol del compuesto del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde

A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



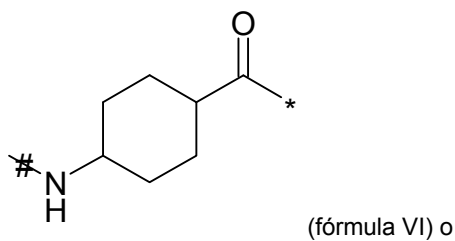
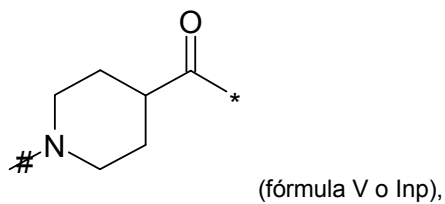
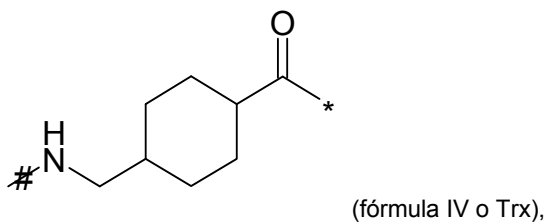


5 en donde n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19, y * es el punto de unión a -B-;

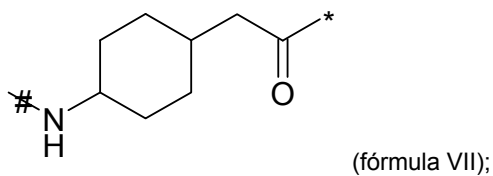
-B- es -B1-, -B2- o sus combinaciones, en donde

-B1- es un elemento de la fórmula IV, V, VI o VII:

10



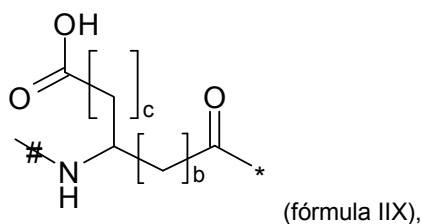
15



en donde * es el punto de unión a -B2- o -C-, y # es el punto de unión a A- o -B2-; y

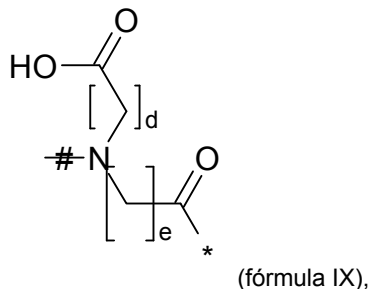
20

-B2- es un elemento de la fórmula IIX o IX o una combinación de hasta cuatro elementos de la fórmula IIX y/o fórmula IX:



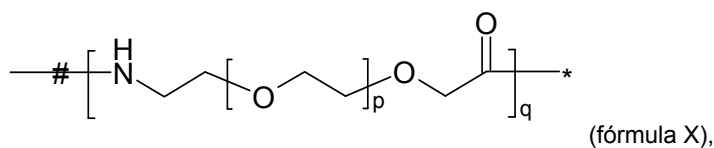
en donde b es 0, 1 o 2, c es 0, 1 o 2, con la condición de que b es 1 o 2 cuando c es 0, y b es 0 cuando c es 1 o 2, * es el punto de unión a -C-, -B1- u otro -B2-, y # es el punto de unión a A-, -B1- u otro -B2- o

5



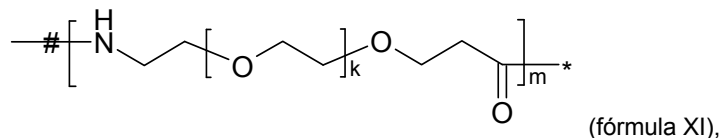
en donde d es 1 o 2, e es 0, 1 o 2, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-; -C- es un elemento de la fórmula X o XI:

10



en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, q es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -B-; o

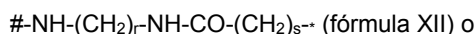
15



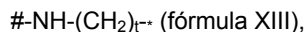
en donde k es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 o 23, m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -D-, -E- o al compuesto del FGF21; y # es el punto de unión a -B-;

20

-D- es un elemento de la fórmula XII o XIII:



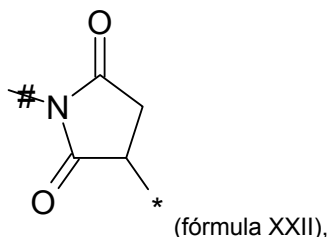
25

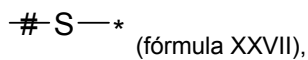
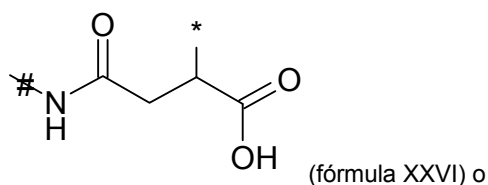
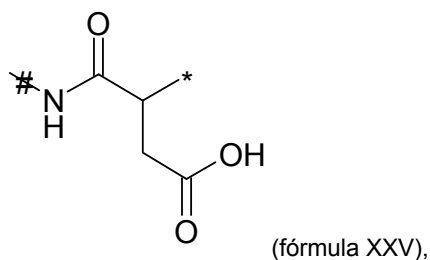
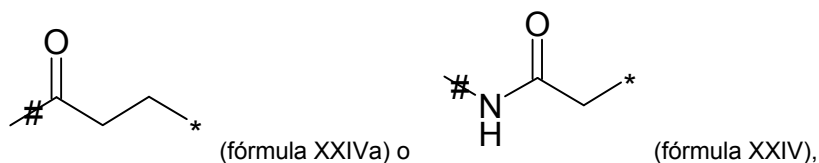
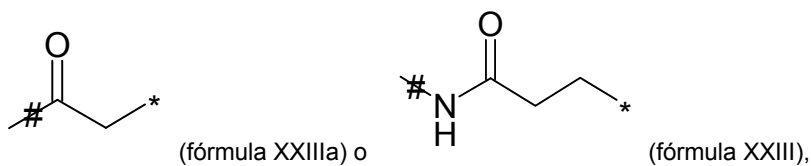


en donde r es 2, 3, 4 o 5, s es 1, 2, 3 o 4, t es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión a -E- o al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -C-;

30

-E- es un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIIIa, XXIV, XXIVa, XXV, XXVI o XXVII;

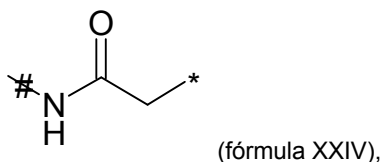
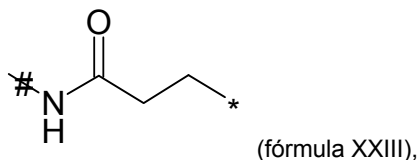
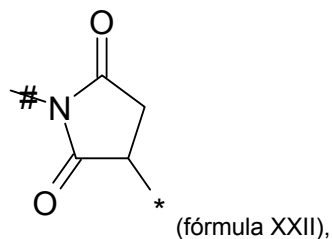


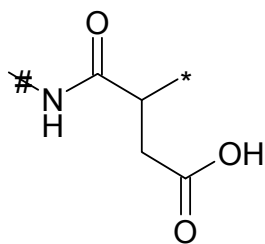


en donde * es el punto de unión al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -D- o -C-;

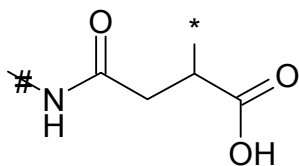
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

8. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, especialmente de acuerdo con las modalidades anteriores, en donde -E- es un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI o XXVII

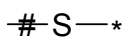




(fórmula XXV),



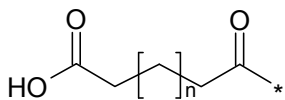
(fórmula XXVI) o



(fórmula XXVII),

en donde * es el punto de unión al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -D- o -C-.

9. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que A- es un elemento de la fórmula I:



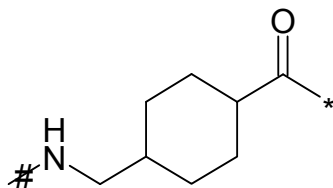
(fórmula I),

en donde n es como se define en la presente descripción.

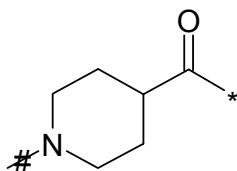
10. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que n es 14, 16 o 18, preferentemente, 14 o 16.

11. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que A- es un elemento de la fórmula I, preferentemente, uno en donde n es 13.

12. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -B- comprende -B1-, preferentemente, un elemento de la fórmula IV o V:

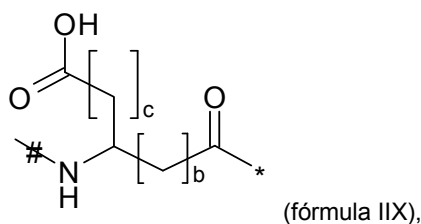


(fórmula IV) o



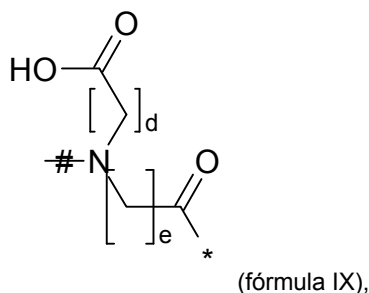
(fórmula V).

13. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -B- comprende -B2-, preferentemente, uno o dos elementos de la fórmula IIX:



en la que con mayor preferencia c es 0 y b es 2 o c es 0 y b es 1.

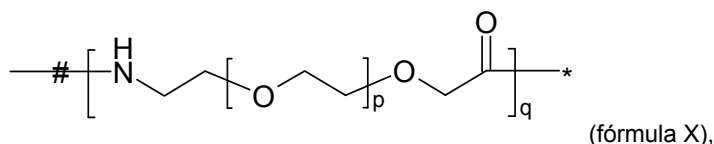
- 5 14. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -B- es -B2-, más precisamente un elemento de la fórmula IX,



- 10 preferentemente, uno en donde d es 1 y e es 2.

15. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -B- es un enlace.

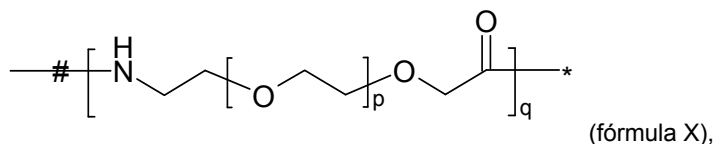
- 15 16. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -C- es un elemento de la fórmula X:



- 20 en el que, preferentemente, q es 0, 1, 2, 3 o 4, con mayor preferencia q es 1 o 2, e incluso con mayor preferencia q es 2.

17. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -C- es un elemento de la fórmula X:

25

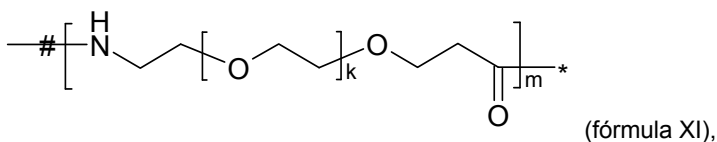


en el que, preferentemente, p es 1 o 2, con mayor preferencia p es 1.

- 30 18. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que p es 1 y q es 1 o 2, preferentemente, p es 1 y q es 2.

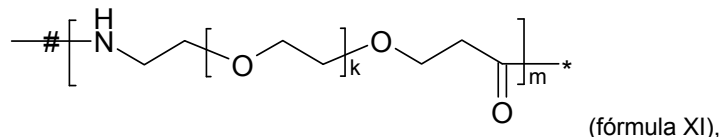
19. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -C- es un elemento de la fórmula XI:

35



en el que, preferentemente, m es 0, 1 o 2, con mayor preferencia m es 1 o 2.

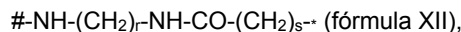
20. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -C- es un elemento de la fórmula XI:



en el que, preferentemente, k es 1, 2, 3, 4, 5 u 11, con mayor preferencia k es 5.

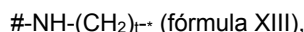
21. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que m es 1 y k es 4, 5 u 11, preferentemente, m es 1 y k es 5.

22. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -D- es un elemento de la fórmula XII:



en el que preferentemente, r es 2, y/o en el que preferentemente, s es 1 o 2, con la máxima preferencia r es 2 y s es 2.

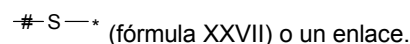
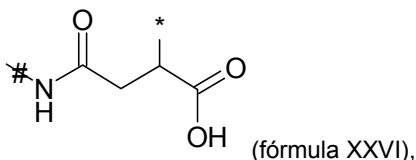
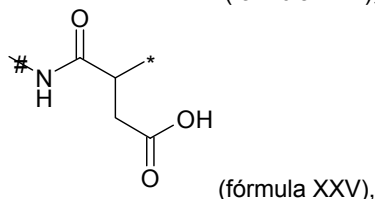
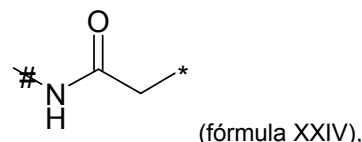
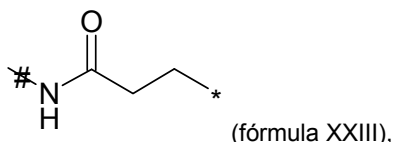
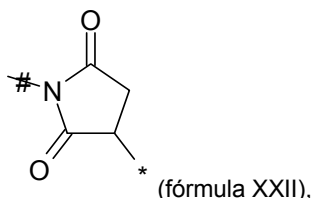
23. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -D- es un elemento de la fórmula XIII:



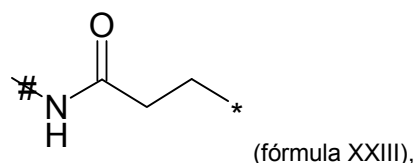
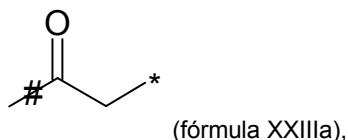
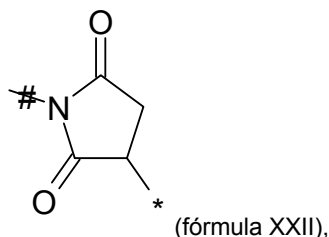
en el que, preferentemente, t es 1, 2 o 3, con mayor preferencia t es 2.

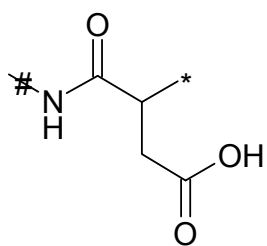
24. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -D- está ausente.

25. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -E- es un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI o XXVII:

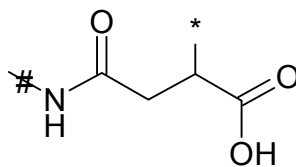


26. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -E- es un elemento de la fórmula XXII, XXIII, XXIIIa, XXV o XXVI:





(fórmula XXV),



(fórmula XXVI), o un enlace.

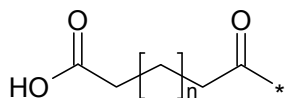
27. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -E- es un elemento de la fórmula XXIV.

28. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene uno o dos aglutinantes de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E-.

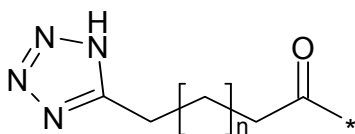
29. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- en donde A- es un elemento de la fórmula I o II, -B- es un enlace o un elemento de la fórmula IIX o IX, -C- es un elemento de la fórmula X, -D- es un elemento de la fórmula XII o XIII, y -E- es un elemento de la fórmula XXII o XXIV, y, preferentemente, n es 13, 14 o 16, b es 2, d es 1, e es 2, p es 1, q es 2, r es 2, s es 2, y t es 2.

30. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene dos aglutinantes de albúmina.

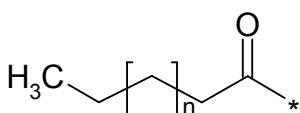
31. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



(fórmula I),



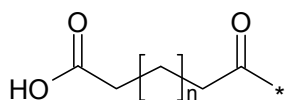
(fórmula II) o



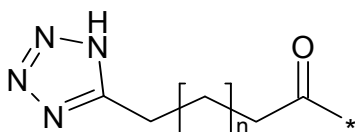
(fórmula III);

en donde n es 10, 11, 12 o 13.

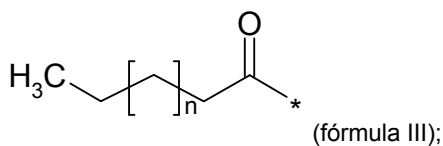
32. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



(fórmula I),



(fórmula II) o

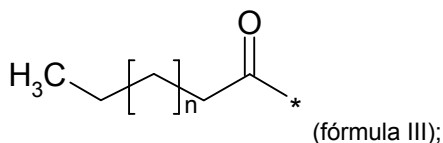
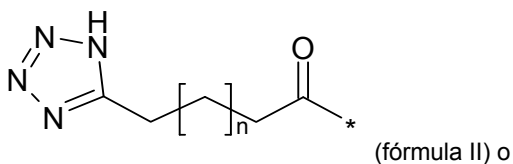
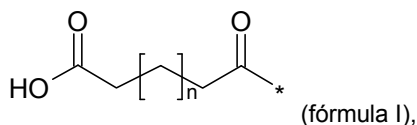


en donde n es 8, 9, 10, 11, 12 o 13.

5 33. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene un aglutinante de albúmina.

34. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:

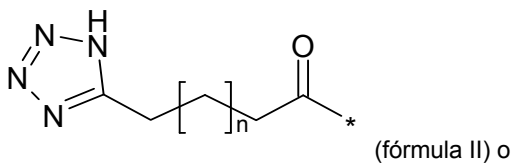
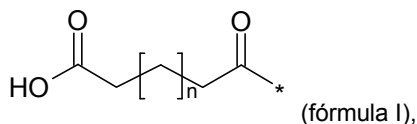
10



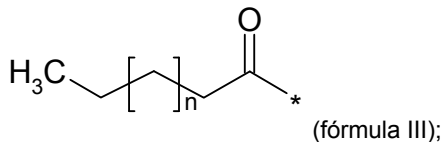
15

en donde n es 14, 15, 16, 17, 18 o 19.

20 35. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



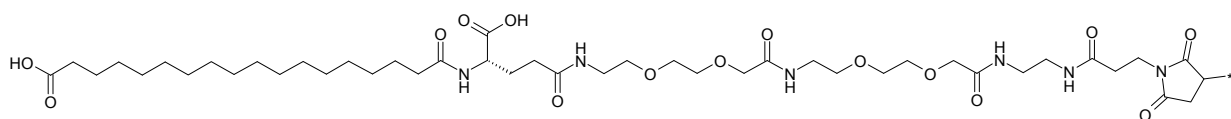
25



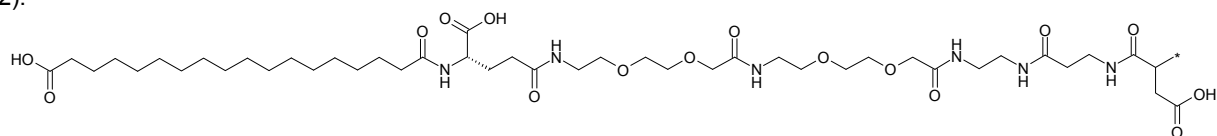
en donde n es 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18.

30 36. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A-B-C-D-E- se selecciona a partir de las siguientes fórmulas (1)-(14):

(1):

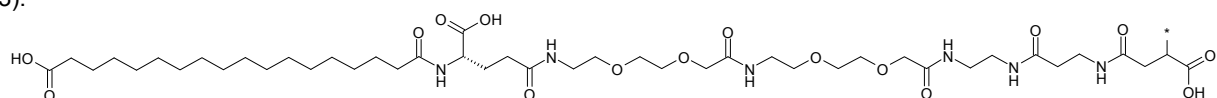


(2):

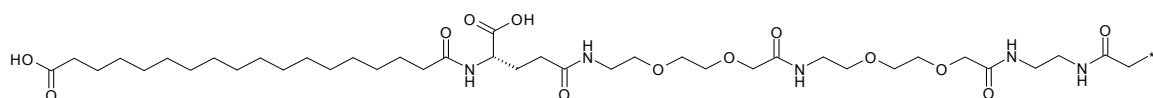


5

(3):

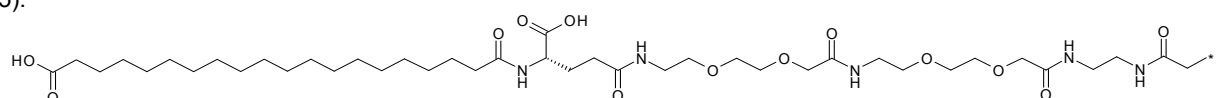


(4):



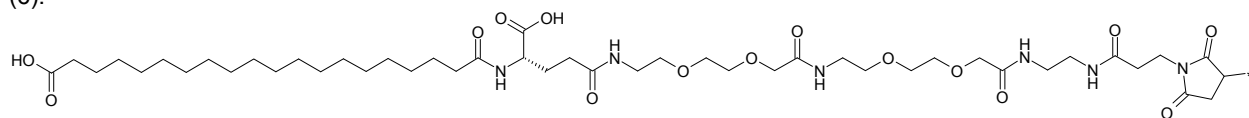
10

(5):

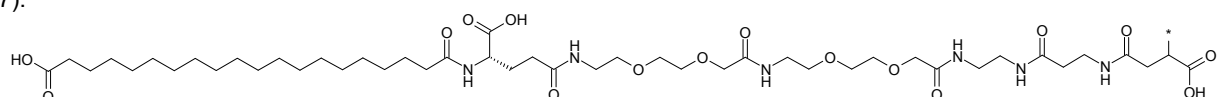


15

(6):

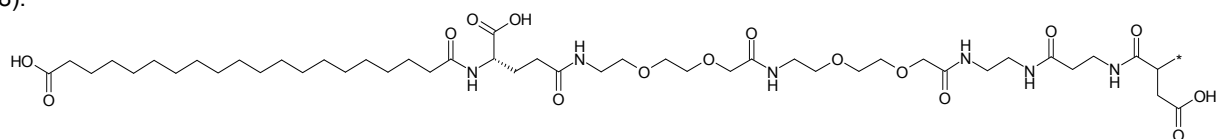


(7):



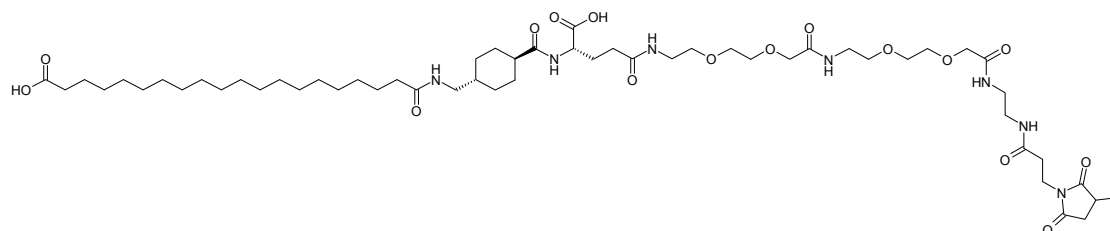
20

(8):

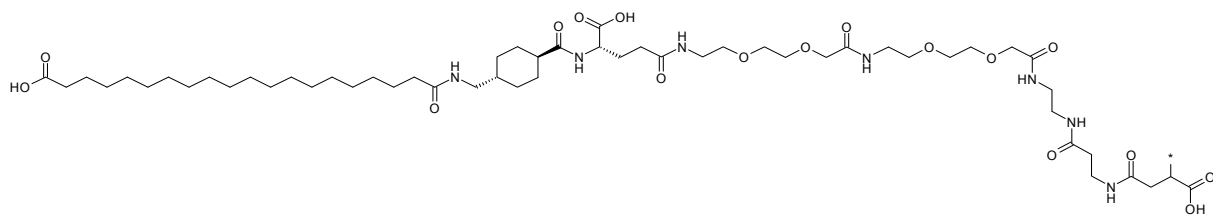


25

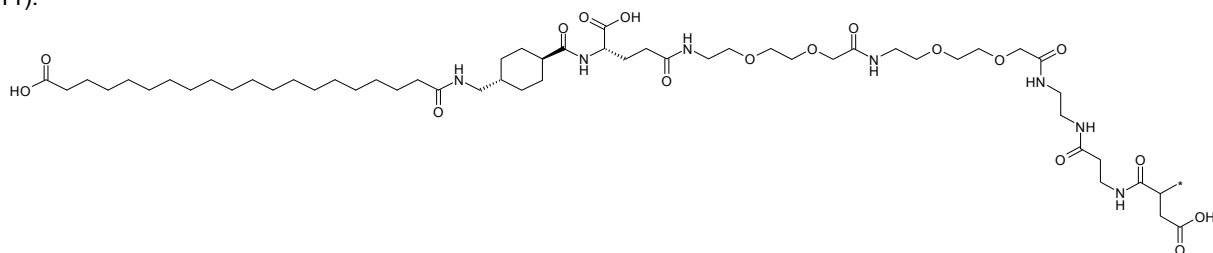
(9):



(10):

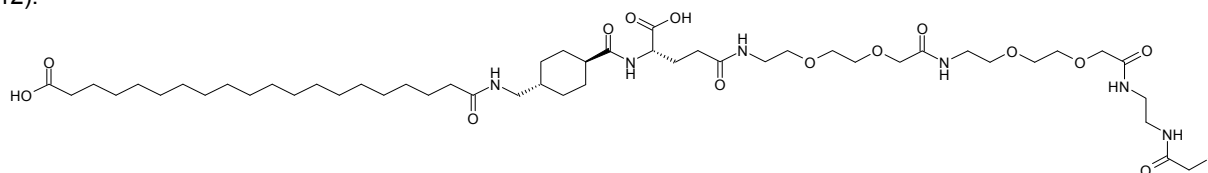


(11):

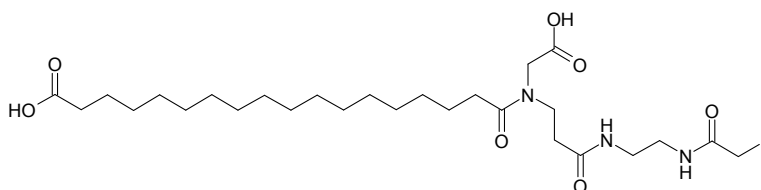


5

(12):

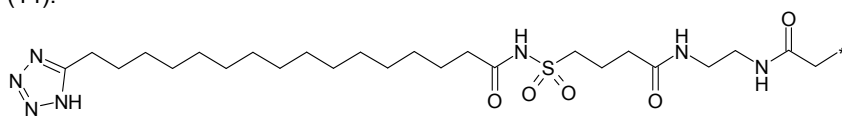


(13):



10

(14):



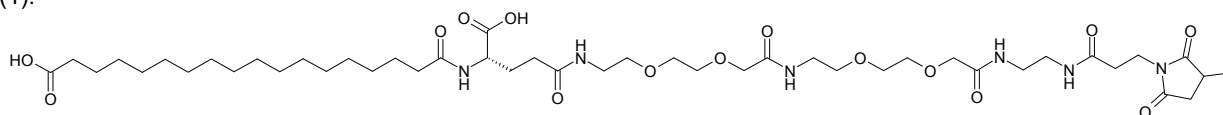
15

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los derivados correspondientes.

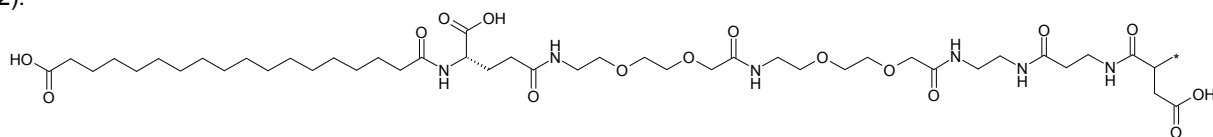
37. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A-B-C-D-E- se selecciona a partir de las siguientes fórmulas (1)-(12):

20

(1):

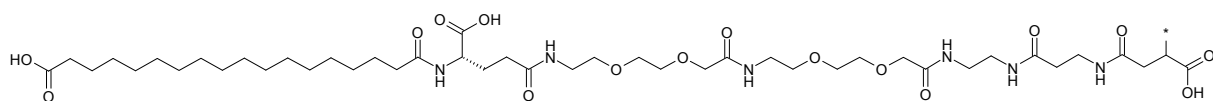


(2):

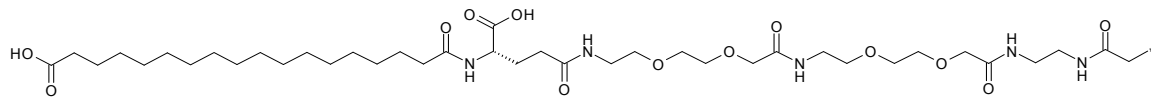


25

(3):

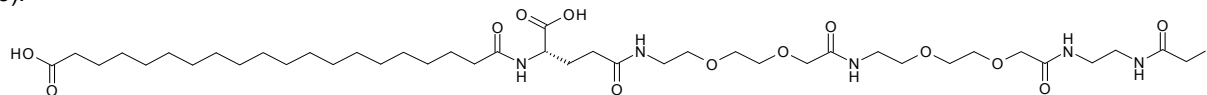


(4):

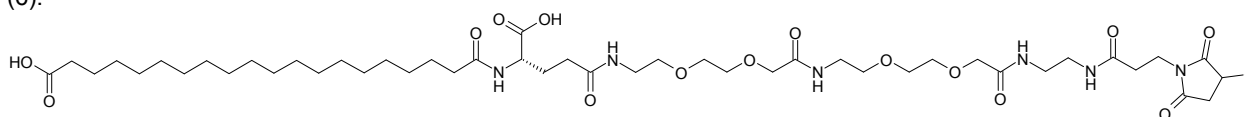


5

(5):

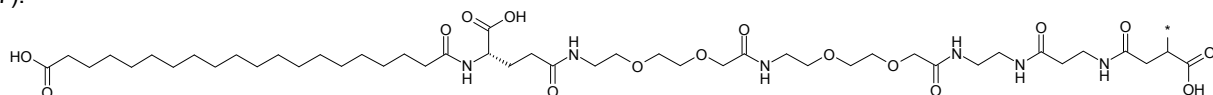


(6):



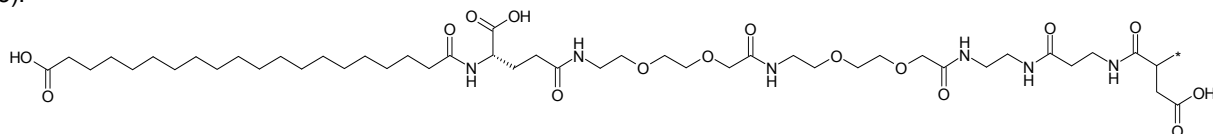
10

(7):

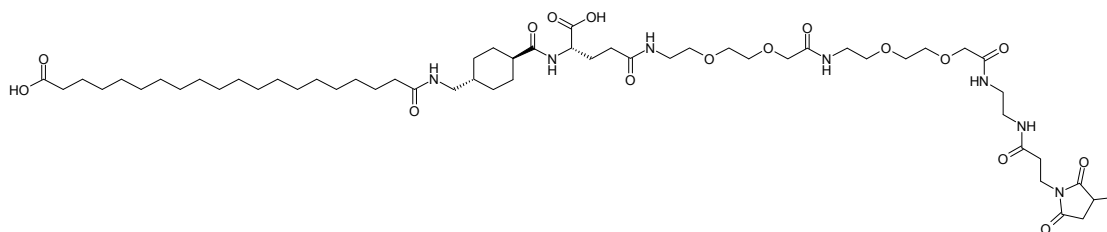


15

(8):

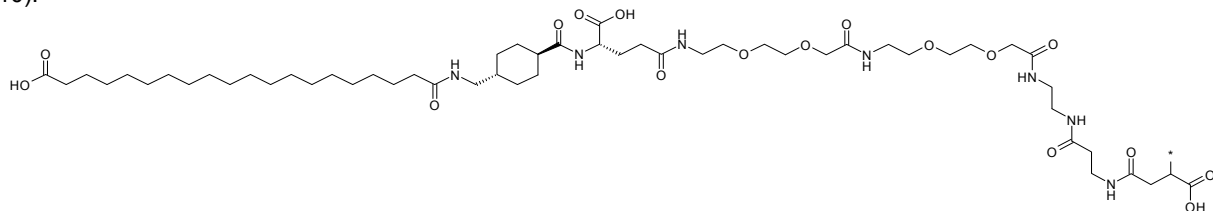


(9):



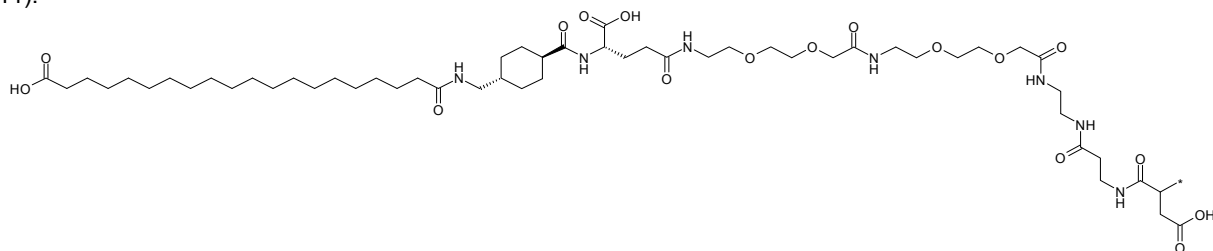
20

(10):

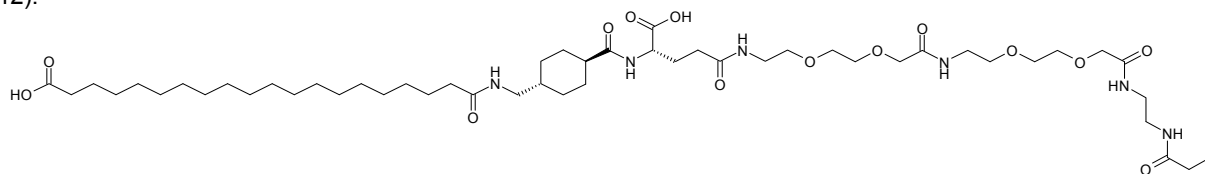


25

(11):



(12):



; o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los derivados correspondientes.

38. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde la unión del aglutinante de albúmina tiene lugar a través del grupo tiol de un residuo de cisteína.

39. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el aglutinante de albúmina está unido a un residuo de cisteína en una o más posiciones seleccionadas a partir de las posiciones -1, 6, 71 y 122 del compuesto del FGF21, en donde la numeración de la posición es por referencia a la sec. con núm. de ident.:1.

40. Un compuesto seleccionado a partir de los derivados de los Ejemplos 4, 5 y 6, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, preferentemente, las siguientes:

S-122-[1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-etil)-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys122]-Met-FGF21 (Compuesto F);

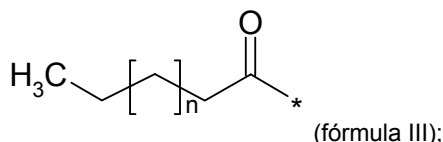
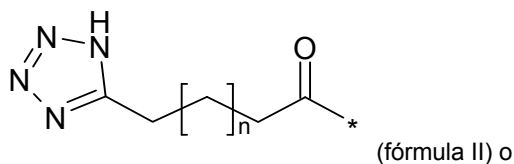
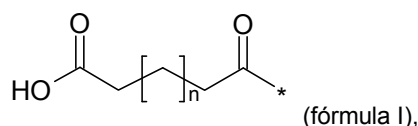
S-71-[1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butiril-amino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-etil)-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys71]Met-FGF21 (Compuesto H);

S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil] [Cys71]Met-FGF21 (Compuesto O);

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de esos compuestos.

41. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C- unido covalentemente a un grupo amino del compuesto del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde

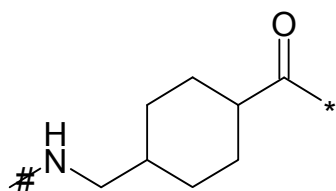
A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



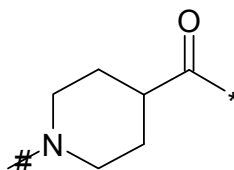
en donde n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19, y * es el punto de unión a -B-;

-B- es -B1-, -B2- o sus combinaciones, en donde

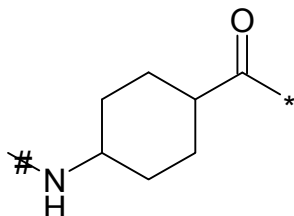
-B1- es un elemento de la fórmula IV, V, VI o VII:



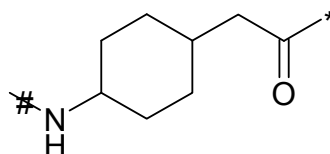
(fórmula IV o Trx),



(fórmula V o Inp),



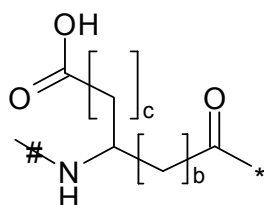
(fórmula VI) o



(fórmula VII);

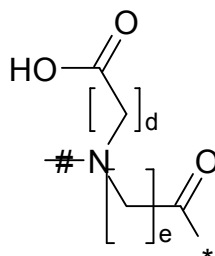
5 en donde * es el punto de unión a -B2- o -C-, y # es el punto de unión a A- o -B2-; y

-B2- es un elemento de la fórmula IIX o IX o una combinación de hasta cuatro elementos de la fórmula IIX y/o fórmula IX:



(fórmula IIX),

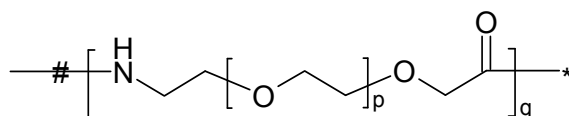
10 en donde b es 0, 1 o 2, c es 0, 1 o 2, con la condición de que b es 1 o 2 cuando c es 0, y b es 0 cuando c es 1 o 2, * es el punto de unión a -C-, -B1- u otro -B2-, y # es el punto de unión a A-, -B1- u otro -B2- o



(fórmula IX),

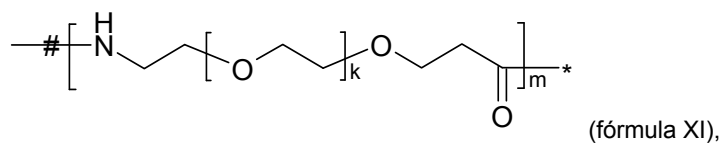
15 en donde d es 1 o 2, e es 0, 1 o 2, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-; y

20 -C- es un elemento de la fórmula X o XI:



(fórmula X),

25 en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, q es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -B-; o

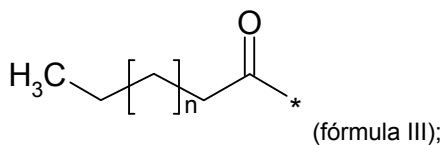
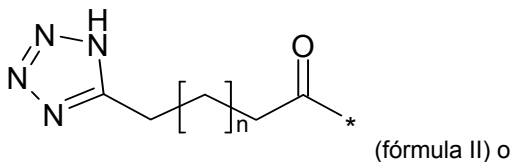
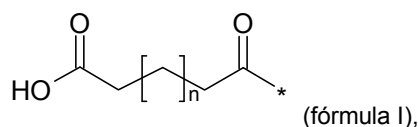


en donde k es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 o 23, m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión al compuesto del FGF21; y # es el punto de unión a -B-;

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

42. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C- unido covalentemente a un grupo amino del compuesto del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde

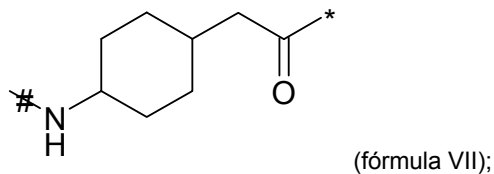
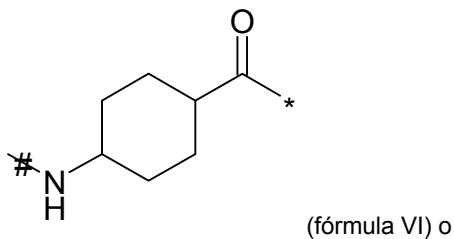
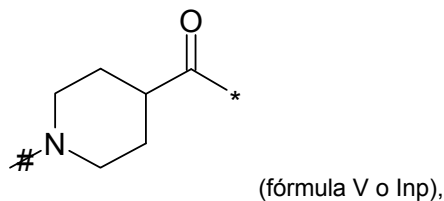
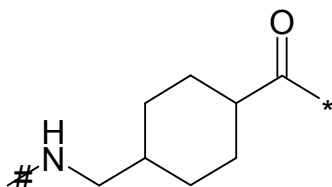
A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



en donde n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19, y * es el punto de unión a -B-;

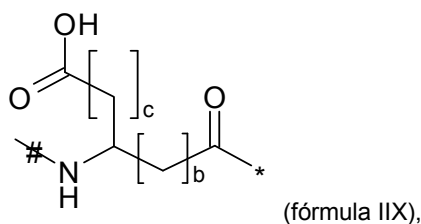
-B- es -B1-, -B2- o sus combinaciones, en donde

-B1- es un elemento de la fórmula IV, V, VI o VII:

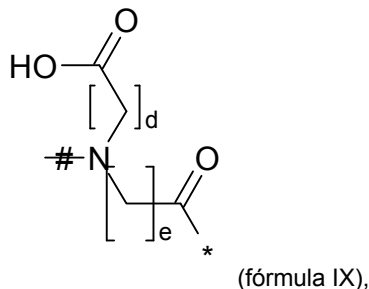


en donde * es el punto de unión a -B2- o -C-, y # es el punto de unión a A- o -B2-; y

-B2- es un elemento de la fórmula IIX o IX o una combinación de hasta cuatro elementos de la fórmula IIX y/o fórmula IX:



en donde b es 0, 1 o 2, c es 0, 1 o 2, con la condición de que b es 1 o 2 cuando c es 0, y b es 0 cuando c es 1 o 2, * es el punto de unión a -C-, -B1- u otro -B2-, y # es el punto de unión a A-, -B1- u otro -B2- o

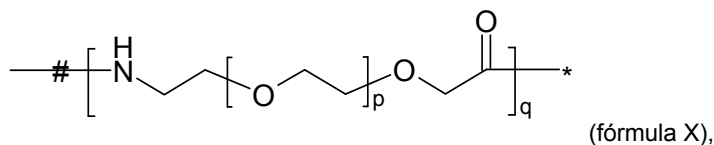


en donde d es 1 o 2, e es 0, 1 o 2, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1-, o

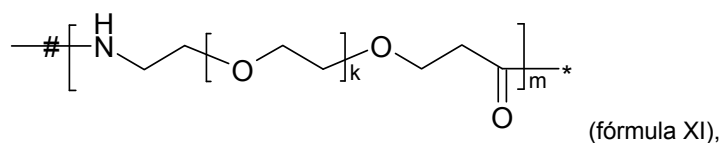


en donde u es 2, 3 o 4, * es el punto de unión a -C- o -B1-, y # es el punto de unión a A- o -B1- y;

-C- es un elemento de la fórmula X o XI:



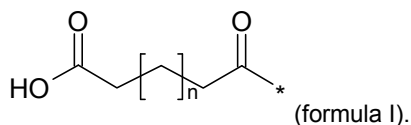
en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, q es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión al compuesto del FGF21, y # es el punto de unión a -B-; o



en donde k es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 o 23, m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, * es el punto de unión al compuesto del FGF21; y # es el punto de unión a -B-;

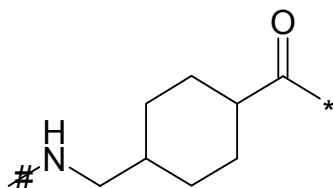
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

43. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, preferentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-3 y 29, en el que A- es un elemento de la fórmula I:

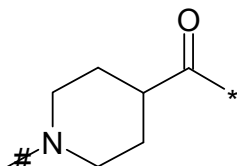


44. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que n es 14, 16 o 18.

45. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -B- comprende -B1-, preferentemente, un elemento de la fórmula IV o V:

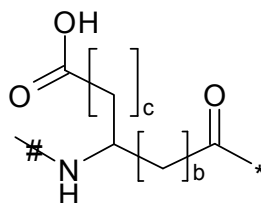


(fórmula IV) o



(fórmula V).

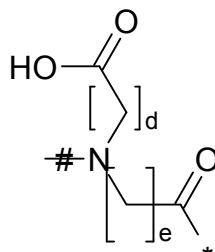
46. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -B- comprende -B2-, preferentemente, uno o dos elementos de la fórmula IIX:



(fórmula IIX),

en el que con mayor preferencia c es 0 y b es 2, o c es 0 y b es 1.

47. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -B- comprende -B2-, preferentemente, uno o dos elementos de la fórmula IX:



(fórmula IX),

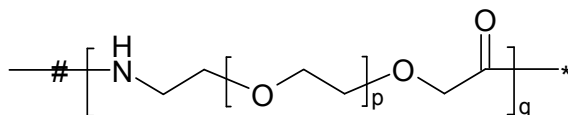
En el que con mayor preferencia d es 1 y e es 2 o, d es 2 y e es 1.

48. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -B- comprende -B2-, preferentemente, uno o dos elementos de la fórmula XXVIII:



en el que con mayor preferencia u es 3.

49. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -C- es un elemento de la fórmula X:

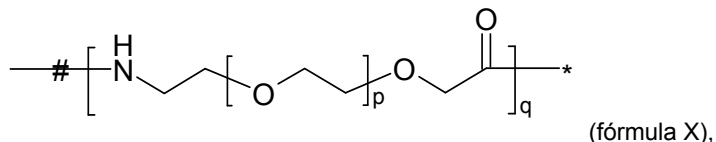


(fórmula X),

en el que preferentemente, q es 0, 1, 2, 3 o 4, con mayor preferencia q es 1 o 2.

50. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -C- es un elemento de la fórmula X:

5

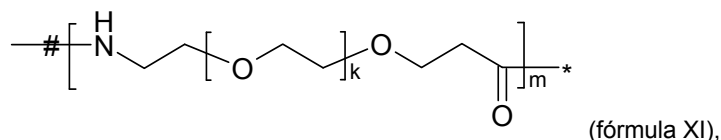


en el que, preferentemente, p es 1 o 2, con mayor preferencia p es 1.

51. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que p es 1 y q es 1 o 2, preferentemente, p es 1 y q es 2.

52. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -C- es un elemento de la fórmula XI:

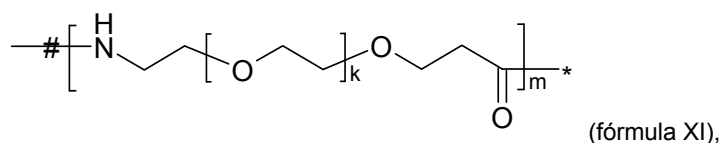
15



en el que, preferentemente, m es 0, 1 o 2, con mayor preferencia m es 1 o 2.

53. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que -C- es un elemento de la fórmula XI:

20



en el que, preferentemente, k es 1, 2, 3, 4, 5 u 11, con mayor preferencia k es 5.

54. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que m es 1 y k es 4, 5 o 11, preferentemente, m es 1 y k es 5.

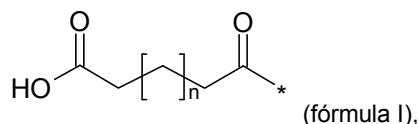
55. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene uno o dos aglutinantes de albúmina de la fórmula A-B-C-.

30

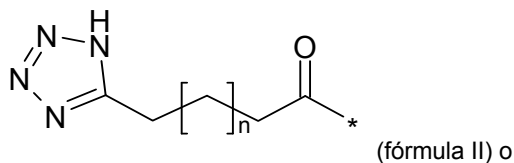
56. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene dos aglutinantes de albúmina.

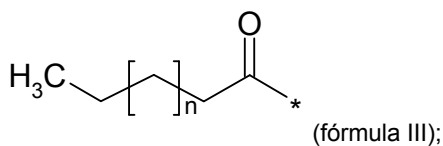
35

57. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



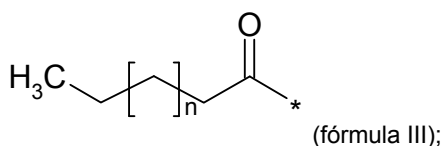
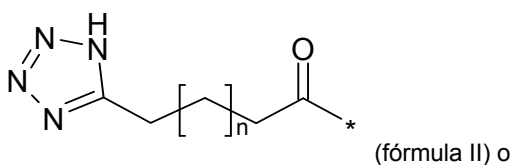
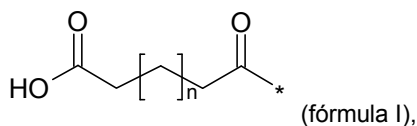
40





en donde n es 10, 11, 12 o 13.

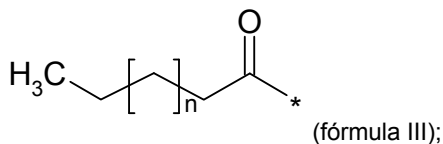
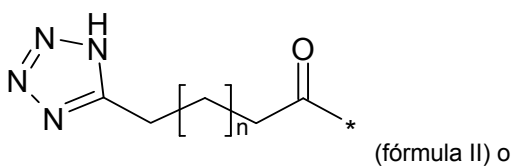
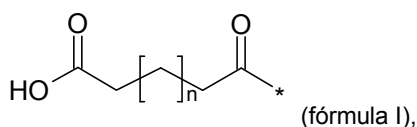
58. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



en donde n es 8, 9, 10, 11, 12 o 13.

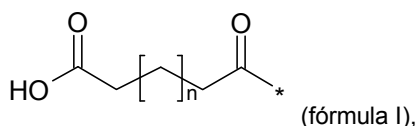
59. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene un aglutinante de albúmina.

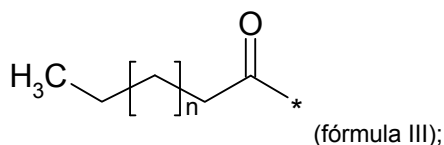
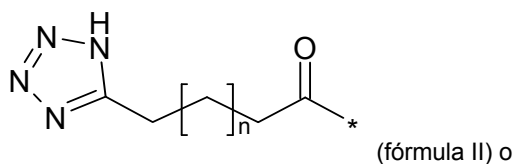
60. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:



en donde n es 14, 15, 16, 17, 18 o 19.

61. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A- es un elemento de la fórmula I, II o III:





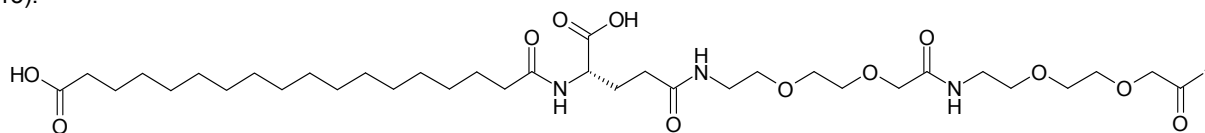
5

en donde n es 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19.

62. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C- unido covalentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A-B-C- se selecciona a partir de las siguientes fórmulas (13)-(19):

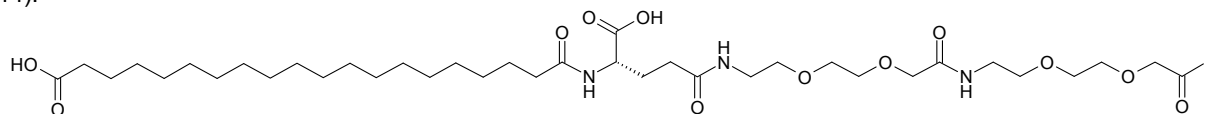
10

(13):

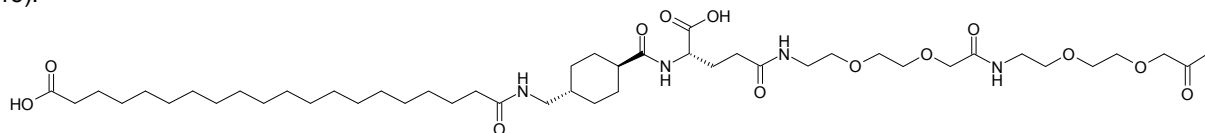


15

(14):

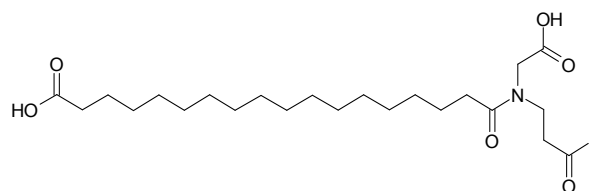


(15):

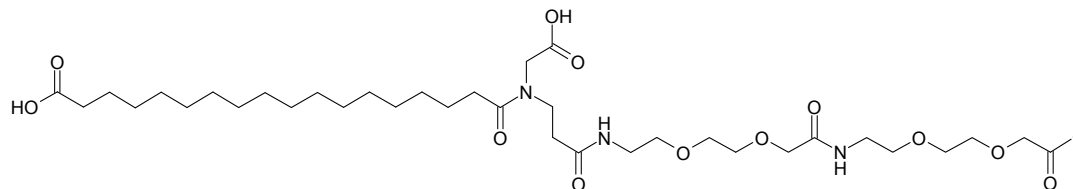


20

(16):

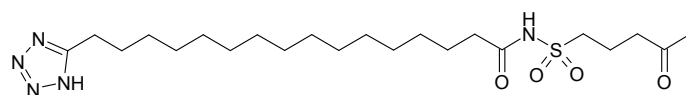


(17):



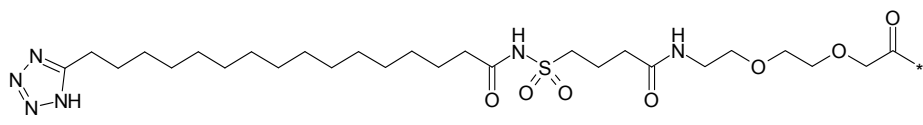
25

(18):



30

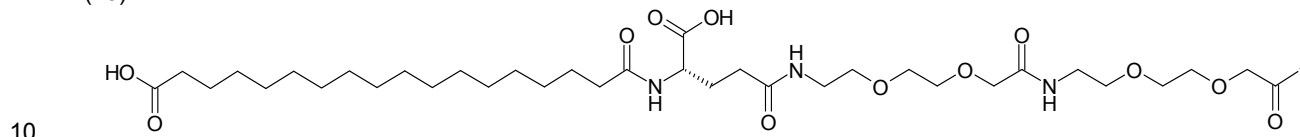
(19):



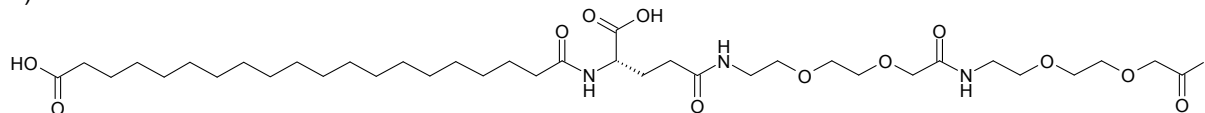
o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los derivados correspondientes.

- 5 63. Un derivado de un compuesto del FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C- unido covalentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde A-B-C- se selecciona a partir de las siguientes fórmulas (13)-(15):

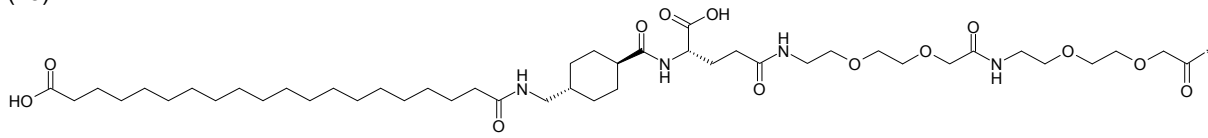
(13):



(14):



(15):



o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los derivados correspondientes.

- 20 64. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde la unión del aglutinante de albúmina tiene lugar a través del grupo amino del residuo de aminoácido del N-terminal.

- 25 65. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde la unión del aglutinante de albúmina tiene lugar a través del grupo épsilon amino de un residuo de lisina.

66. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que un aglutinante de albúmina se une al residuo de aminoácido del N-terminal y el otro a un residuo de lisina interno.

- 30 67. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el aglutinante(s) de albúmina se une(n) a un residuo de lisina en una o más posiciones seleccionadas a partir de las posiciones 56, 59, 69, 122 y 152 del compuesto del FGF21, en donde la numeración de la posición es por referencia a la sec. con núm. de ident.:1.

- 35 68. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, preferentemente, del Ejemplo 7, preferentemente, el siguiente:

N-alfa1-[2-(2-[2-(2-[2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Met-FGF21 (Compuesto V);

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

- 40 69. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 tiene una identidad de al menos 80 %, con la sec. con núm. de ident.:1, preferentemente, al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 %.

- 45 70. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 tiene un máximo de 36 modificaciones de aminoácidos en comparación con la sec. con núm. de ident.:1, preferentemente, un máximo de 30, 25, 20, 15, 10 o 5 cambios de aminoácidos, o un máximo de 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 cambio(s) de aminoácidos; con mayor preferencia un máximo de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 modificaciones de aminoácidos; incluso con mayor preferencia un máximo de 9, 8, 7, 6 o 5

modificaciones de aminoácidos; o con la máxima preferencia un máximo de 4, 3, 2 o 1 modificación(s) de aminoácido(s).

71. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 tiene una extensión del N-terminal de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos.

72. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son glicina o serina.

73. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1.

74. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 comprende

(a) al menos una de las siguientes modificaciones en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: -1M, -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, L118C, K122C, K122R, A134C, I152K, L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E y/o S181K,R (preferentemente, al menos una de las siguientes: -1M, -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, L118C, K122C, K122R, A134C, I152K y/o M168L); y/o

(b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son G o S.

75. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 comprende

(a) las siguientes modificaciones, en comparación con la sec. con núm. de ident.:1:

(i) K122C, (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, M168L, (Y179F, A180E, S181R), (V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) y/o (L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) (preferentemente, K122C, (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E y/o M168L),

(ii) -1G y (-1G, M168L), o

(iii) S6C, (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R) y (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R),

en donde el compuesto del FGF21 de (i) y (iii) puede además, opcionalmente, incluir una M en el N-terminal; y/o

(b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 seleccionada a partir de las siguientes:

(iv) MG-, MC-, MS-, MSGSGSGSGSG-, MGGGGG-, MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, MSGGGGG-, MSGSGGS-, MSGGSSG- y MSGSGSG-,

en donde la M del N-terminal en cada uno de los compuestos del FGF21 de (iv) puede eliminarse, opcionalmente.

76. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 comprende las siguientes sustituciones en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: (a) K122C; (b) (K59R, K69R, K122R); (c) (K56R, K69R, K122R); (d) (K56R, K59R, K69R); (e) S71C; (f) S6C; (g) (K56R, K59R, K69R, K122R); (h) (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K); (i) (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R); (j) (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R); o (k) M168L.

77. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 comprende las siguientes modificaciones en comparación con la sec. con núm. de ident.: 1:

Y179F, A180E y S181K o S181R (i); preferentemente, adicionalmente V169aT, P171L, S172E, Q173A y G174V (ii); con mayor preferencia, adicionalmente L166F, S167G y M168L (iii); con la máxima preferencia (i), (ii) y (iii), en donde cada modalidad independientemente y opcionalmente incluye una M en el N-terminal (por ejemplo, -1M).

5 78. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 comprende las siguientes modificaciones en comparación con el FGF21 (sec. con núm. de ident.:1): (i) Met-Gly- en el N-terminal, (ii) M168L, (iii) modalidad (i) y (ii), (iv) Met-Cys- en el N-terminal, (v) Gly- en el N-terminal, (vi) modalidad (v) y (ii), (vii) Met-Ser- en el N-terminal, o (viii) Ser- en el N-terminal; preferentemente, el compuesto del FGF21 se selecciona a partir de los siguientes: (l) Met-Gly-FGF21, (m) Met-Gly-FGF21-M168L, (n) Met-Cys-FGF21, (o) Gly-FGF21-M168L, (p) Gly-FGF21, (q) Met-Ser-FGF21, o (r) Ser-FGF21; en donde FGF21 se refiere al polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1.

15 79. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 comprende las siguientes extensiones en el N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: (q) MS-FGF21, (s) MSGSGSGSGSG-, (t) MGGGGG-, (u) MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, (v) MSGGGGGG-, (x) MSGSGGS-, (y) MSGGSSG- y (z) MSGSGSGSG-; así como también cualquiera de las modalidades (q), (s), (t), (u), (v), (x), (y) y (z) sin la Met del N-terminal.

20 80. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 se selecciona a partir de las siguientes variantes del polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1: (a) K122C, (e) S71C, (f) S6C, (n) Met-Cys-FGF21, cualquiera de los compuestos (a), (e) y (f) con una Met en el N-terminal, y el compuesto (n) sin la Met en el N-terminal.

25 81. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 se selecciona a partir de las siguientes variantes del polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1: (b) (K59R, K69R, K122R); (c) (K56R, K69R, K122R); (d) (K56R, K59R, K69R); (g) (K56R, K59R, K69R, K122R); (h) (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K); (i) (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R); (j) (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R); (k) (179F, 180E, 181R); (l) (169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K); y (m) (166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K); así como también cualquiera de los compuestos (b), (c), (d), (g), (h), (i) y (j) con una Met en el N-terminal (preferentemente, (b)-(j) +/- Met en el N-terminal).

82. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene una prolina en la posición 146, en donde el número de la posición se refiere a la sec. con núm. de ident.:1.

35 83. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene un T $\frac{1}{2}$ cuando se administra s.c. en ratones de al menos 1,5 horas, preferentemente, al menos 2 horas, con mayor preferencia al menos 4 horas, incluso con mayor preferencia al menos 5 horas, o con la máxima preferencia al menos 6 horas.

40 84. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que tiene un T $\frac{1}{2}$ cuando se administra s.c. en ratones de al menos 10 horas, preferentemente, al menos 15 horas, con mayor preferencia al menos 24 horas, o con la máxima preferencia al menos 48 horas.

45 85. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que (i) los ratones son ratones db/db, preferentemente, ratones que carecen del receptor de leptina, y/o (ii) la dosificación del derivado es 0,5 mg/kg.

50 86. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, que tiene una potencia de al menos 1 %, preferentemente, de al menos 5 %, con mayor preferencia de al menos 10 %, incluso con mayor preferencia de al menos 20 %, o con la máxima preferencia de al menos 30 %, relativa a la potencia del Met-FGF21, en donde la potencia se determina mediante la medición de la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1.

55 87. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, que tiene una potencia de al menos 40 %, preferentemente, de al menos 50 %, con mayor preferencia de al menos 60 %, incluso con mayor preferencia de al menos 70 %, relativa a la potencia del Met-FGF21.

60 88. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, que tiene una potencia de al menos 80 %, preferentemente, al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 100 %, incluso con mayor preferencia al menos 110 %, o con la máxima preferencia al menos 120 %, relativa a la potencia del Met-FGF21.

89. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, en el que la potencia se calcula como la EC_{50} del derivado relativa a la EC_{50} del Met-FGF21.
- 5 90. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, en el que los adipocitos 3T3-L1 se derivan de fibroblastos de ratón 3T3-L1, preferentemente, ATCC CL-173.
- 10 91. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, en el que la captación de la glucosa en los adipocitos 3T3-L1 se mide como se describe en el Ejemplo 8.
- 15 92. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, que tiene una potencia de al menos 1% relativa a la potencia del Met-FGF21, en donde la potencia se determina como se describe en cualquiera de las modalidades 64-69.
- 20 93. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, en donde la potencia relativa al Met-FGF21 es al menos 1 %, preferentemente, al menos 5 %, con mayor preferencia al menos 10 %, incluso con mayor preferencia al menos 20 %, o con la máxima preferencia al menos 30 %.
- 25 94. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, en donde la potencia relativa al Met-FGF21 es al menos 40 %, preferentemente, al menos 50 %, con mayor preferencia al menos 60 %, o con la máxima preferencia al menos 70 %.
- 30 95. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, en donde la potencia relativa al Met-FGF21 es al menos 80 %, preferentemente, al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 100 %, incluso con mayor preferencia al menos 110 %, o con la máxima preferencia al menos 120 %.
- 35 96. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, que es capaz de disminuir la glucosa en sangre in vivo en ratones db/db relativo al control de vehículo.
- 40 97. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde la glucosa en sangre disminuye 24 horas, preferentemente, 48 horas, después de que se administra una última dosis del derivado.
- 45 98. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, en donde la glucosa en sangre disminuye en al menos 10 %, preferentemente, en al menos 15 %, con mayor preferencia en al menos 20 %, incluso con mayor preferencia en al menos 25 %, o con la máxima preferencia en al menos 30 %, en base a la media de la glucosa en sangre medida en mM y relativa al control de vehículo correspondiente.
- 50 99. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, en donde la glucosa en sangre disminuye en al menos 35 %, preferentemente, en al menos 40 %, con mayor preferencia en al menos 45 %, o con la máxima preferencia en al menos 50 %.
- 55 100. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde (i) los ratones db/db son machos y de 9-11 semanas de edad, (ii) el derivado se administra s.c., (iii) la dosificación del derivado está en el intervalo de 0,2-1,0 mg/kg, preferentemente, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 o 1,0 mg/kg, (iv) el derivado se disuelve en PBS, (v) el derivado se administra una vez al día, preferentemente, en el día 1, día 2 y día 3, (vi) el control de vehículo se trata con PBS, preferentemente, 250 μ l/50 g ratón, y/o (vii) la glucosa en sangre se mide mediante el uso del método de la glucosa oxidasa, preferentemente, mediante el uso de un analizador de glucosa tal como Biosen 5040.
- 60 101. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el control de vehículo se reemplaza por el Met-FGF21.
102. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, que es más estable

que el Met-FGF21 después de la oxidación mediante la incubación en presencia de H₂O₂ 300 mM durante 1 hora a 25 °C.

103. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, en el que la estabilidad se refiere a la potencia, determinada de acuerdo con cualquiera de las modalidades 70-75.

104. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, o un análogo del FGF de acuerdo con cualquiera de las modalidades más abajo, a la medida de lo posible, que después de la incubación con H₂O₂ tiene una potencia de al menos 15 %, preferentemente, al menos 20 %, con mayor preferencia al menos 30 %, incluso con mayor preferencia al menos 40 %, o con la máxima preferencia al menos 50 %, en donde la potencia es relativa al Met-FGF21 tratado de la misma manera, pero entonces sin H₂O₂.

105. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que (i) el derivado y Met-FGF21 se disuelven ambos en PBS, pH 7,2, y/o (ii) la concentración del derivado y del Met-FGF21 es 1 mg/mL.

106. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es cualquiera de los derivados específicos mencionados en los ejemplos anteriores 4-7 y 12-55.

107. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-metil) [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181K] Ala-FGF21.

108. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-metil) [28R, 56R, 59R, 69R, S71C, 102T, 121Q, 122R, 166F, 167G, 168L, 170T] Ala-FGF21.

109. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etil]-etoxi]-etil] [Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T] Ala-FGF21.

110. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etil]-etoxi]-etil] [K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des S181] Ala-FGF21.

111. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)-butiril] [K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des S181] Ala-FGF21.

112. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)-butiril] [Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T] Ala-FGF21.

113. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-metil) (Q28R, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ala-FGF21.

114. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etil]-etoxi]-etil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R) Gly-FGF21.

115. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etil]-etoxi]-etil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R) Ala-FGF21.

116. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etil]-etoxi]-etil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R) Ser-FGF21.

117. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R) FGF21.
- 5 118. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Gly-FGF21.
- 10 119. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ala-FGF21.
- 15 120. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ser-FGF21.
- 20 121. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) FGF21.
- 25 122. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21.
- 30 123. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil) (S71C, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21.
- 35 124. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21.
- 40 125. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21.
- 45 126. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-hepta-decanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21.
- 50 127. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil) (S71C, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21.
- 55 128. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21.
- 60 129. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS,

153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21.

130. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil)-metil) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) FGF21.

131. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil)-metil) (S71C, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) FGF21.

132. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) FGF21.

133. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, que es N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetil] (K56R, K59R, K69R, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) FGF21.

134. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que el compuesto del FGF es un análogo del FGF, que es cualquiera de los análogos específicos mencionados en los ejemplos anteriores 2 (preferentemente, los ejemplos 2a-2af), 56 (preferentemente, los ejemplos 56a-56as) y 57 (preferentemente, los ejemplos 57a-57v).

135. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que el compuesto del FGF es un compuesto del FGF presente en cualquiera de los ejemplos 4-7 y 12-55 en la presente descripción.

136. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que el compuesto del FGF es (Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ala-FGF21.

137. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que el compuesto del FGF es (S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21.

138. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que el compuesto del FGF es (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21.

139. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en el que el compuesto del FGF es (Q28R, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ala-FGF21.

140. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, a la medida de lo posible, en donde el compuesto del FGF21 es cualquiera de los análogos del FGF21 mencionados en cualquiera de las siguientes modalidades.

141. Un análogo del FGF21 que comprende

(a) al menos una de las siguientes modificaciones en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: -1G, -1C, -1S, -1A, S6C, S6K, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102E, D102T, N121Q, K122R, I152K, L166F, S167G, M168L, V169aT, G170T, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E y/o S181K,R (preferentemente, -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, K122R, I152K y/o M168L); y/o (b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor

preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son G o S.

142. Un análogo del FGF21 que comprende

(a) al menos una de las siguientes modificaciones en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, K122R, I152K, L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E y/o S181K,R (preferentemente, -1G, -1C, -1S, S6C, S6K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, K122R, I152K y/o M168L); y/o

(b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son G o S.

143. Un análogo del FGF21 que comprende (a) al menos una de las siguientes modificaciones con respecto a la sec. con núm. de ident.:1: -1A, -1C, -1S, -1G, S6K, S6C, Q15F, V16K, D24K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102E, D102N, D102T, des121D, D121D, D121Q, K122R, P143V, A145E, 145aP, 145bM, L146V, L146E, 148aD, P149L, P149E, P150R, G151E, I152E, I152K, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, I154F, I154R, P155S, P155G, Q156H, Q156S, P157L, P158L, P158E, D159E, D159S, V160D, V160T, G161M, G161D, S162F, S163M, D164S, L166F, S167E, S167G, M168T, M168A, M168I, M168L, M168S, V169D, 169aT, G170T, G170S, P171M, P171L, S172D, S172E, Q173P, Q173A, G174F, G174A, G174V, R175G, S176L, P177V, S178T, Y179G, Y179F, A180E, S181K, S181R, 182G, y/o (b) una extensión del N-terminal con respecto a la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50%, preferentemente, al menos 60%, con mayor preferencia al menos 70%, incluso con mayor preferencia al menos 80%, o con la máxima preferencia al menos 90% de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son G o S o al menos una de las siguientes modificaciones -15E, -14E, -13E, -12A, -10A, -11A, -11E, -10S, -9G, -8G, -8A, -7A, -6A, -6G, -5G, -4S, -3A, -3G, -2A, -2G, -2S.

144. Un análogo del FGF21 que comprende (a) al menos una de las siguientes modificaciones con respecto a la sec. con núm. de ident.:1: -1A, -1C, -1S, -1G, S6K, S6C, Q15F, V16K, D24K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102E, D102N, D102T, des121D, D121D, D121Q, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152K, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, I154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168A, M168I, M168L, M168S, 169aT, G170T, P171L, S172E, Q173A, G174A, G174V, Y179F, A180E, S181K, S181R, 182G, y/o (b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50%, preferentemente, al menos 60%, con mayor preferencia al menos 70%, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son G o S o al menos una de las siguientes modificaciones -15E, -14E, -13E, -12A, -10A, -11A, -11E, -10S, -9G, -8G, -8A, -7A, -6A, -6G, -5G, -4S, -3A, -3G, -2A, -2G, -2S.

145. Un análogo del FGF21 que comprende (a) al menos una de las siguientes modificaciones con respecto a la sec. con núm. de ident.:1: -1A, -1C, -1S, -1G, S6K, S6C, Q15F, V16K, D24K, A26E, Q27E, Q28R, A31E, K56R, K59R, K69R, S71C, D102E, D102N, D102T, des121D, D121D, D121Q, K122R, I152K, D159E, L166F, S167G, M168A, M168I, M168L, M168S, 169aT, G170T, P171L, S172E, Q173A, G174A, G174V, Y179F, A180E, S181K, S181R, 182G, y/o (b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son G o S o al menos una de las siguientes modificaciones -15E, -14E, -13E, -12A, -10A, -11A, -11E, -10S, -9G, -8G, -8A, -7A, -6A, -6G, -5G, -4S, -3A, -3G, -2A, -2G, -2S.

146. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, en donde dicho análogo del FGF21 contiene no más de 210 residuos de aminoácidos, preferentemente, no más de 209 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia no más de 206 residuos de aminoácidos.

147. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, en donde si la extensión del N-terminal es solamente un único aminoácido, dicho aminoácido es distinto de Met.

5 148. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que comprende

(a) las siguientes modificaciones, en comparación con la sec. con núm. de ident.:1:

10 (i) (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, M168L, (Y179F, A180E, S181R), (V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K), (L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) (preferentemente, (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, o M168L),

15 (ii) -1G y (-1G, M168L), o

(iii) S6C, (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R) y (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R),

20 en donde el análogo del FGF21 de (i) y (iii) puede además, opcionalmente, incluir una M en el N-terminal; y/o

(b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 seleccionada a partir de las siguientes:

25 (iv) MG-, MC-, MS-, MSGSGSGSGSG-, MGGGGG-, MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, MSGGGGG-, MSGSGGS-, MSGGSSG- y MSGSGSG-,

30 en donde la M del N-terminal en cada uno de los análogos del FGF21 de (iv) puede eliminarse, opcionalmente.

149. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que comprende

35 (a) las siguientes modificaciones, en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, M168L, (Y179F, A180E, S181R), (V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K), o (L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) (preferentemente, (K59R, K69R, K122R), (K56R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), S71C, (K56R, K59R, K69R, K122R), o (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K), D102T, A26E, (Q28R, A31E), Q27E, o M168L), en donde el análogo del FGF21 puede además, opcionalmente, incluir una M en el N-terminal; y/o (b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 seleccionada a partir de los siguientes:

40 (iv) MG-, MC-, MS-, MSGSGSGSGSG-, MGGGGG-, MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, MSGGGGG-, MSGSGGS-, MSGGSSG- y MSGSGSG-, en donde la M en el N-terminal en cada uno de los análogos del FGF21 de (iv) puede eliminarse, opcionalmente.

50 150. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que comprende (a) las siguientes modificaciones, en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: -1G y (-1G, M168L); y/o (b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 seleccionada a partir de los siguientes: (iv) MG-, MC-, MS-, MSGSGSGSGSG-, MGGGGG-, MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, MSGGGGG-, MSGSGGS-, MSGGSSG- y MSGSGSG-, en donde la M en el N-terminal en cada uno de los análogos del FGF21 de (iv) puede eliminarse, opcionalmente.

55 151. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que comprende (a) las siguientes modificaciones, en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: S6C, (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R) y (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R), en donde el análogo del FGF21 puede además, opcionalmente, incluir una M en el N-terminal; y/o (b) una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 seleccionada a partir de los siguientes: (iv) MG-, MC-, MS-, MSGSGSGSGSG-, MGGGGG-, MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, MSGGGGG-, MSGSGGS-, MSGGSSG- y MSGSGSG-, en donde la M en el N-terminal en cada uno de los análogos del FGF21 de (iv) puede eliminarse, opcionalmente.

60 152. Un análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que comprende una o más de las siguientes modificaciones, con respecto al polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1: S6C, S6K, K56R, K59R, K69R, S71C, K122R, I152K, L166F, S167G, M168L, V169aT,

P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E y/o S181K,R (preferentemente, S6C, S6K, K56R, K59R, K69R, S71C, K122R, I152K y/o M168L).

5 153. Un análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que comprende una o más de las siguientes modificaciones, con respecto al polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1: S6C, S71C, M168L, (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), (K56R, K69R, K122R), (K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K) y (K56R, K59R, K69R, K122R, L118C-A134C), (L166F, S167G, M168L, V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K), (V169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) y/o (Y179F, A180E, S181R);
10 preferentemente, (S6C, S71C, M168L, (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R), (K56R, K69R, K122R), (K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R), (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K) y/o (K56R, K59R, K69R, K122R, L118C-A134C).

15 154. Un análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que comprende Y179F, A180E y S181K o S181R (i); preferentemente, que comprende adicionalmente V169aT, P171L, S172E, Q173A y G174V (ii); con mayor preferencia que comprende adicionalmente L166F, S167G y M168L (iii); con la máxima preferencia que comprende (i), (ii) y (iii).

20 155. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, preferentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 89-90 que incluye 90a, que incluye, además, una Met en la posición -1 de la sec. con núm. de ident.:1.

25 156. Un análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, seleccionadas a partir de lo siguiente: (l) Met-Gly-FGF21, (m) Met-Gly-FGF21-M168L, (n) Met-Cys-FGF21, (o) Gly-FGF21-M168L, (p) Gly-FGF21, (q) Met-Ser-FGF21, o (r) Ser-FGF21; en donde FGF21 designa el polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1.

30 157. Un análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que tiene una extensión del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de hasta 25 residuos de aminoácidos, preferentemente, hasta 20 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia hasta 15 residuos de aminoácidos, incluso con mayor preferencia hasta 10 residuos de aminoácidos, o con la máxima preferencia hasta 6 residuos de aminoácidos, en donde al menos 50 %, preferentemente, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, o con la máxima preferencia al menos 90 % de los residuos de aminoácidos que extienden el N-terminal son glicina o serina.

35 158. Un análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, preferentemente, el análogo de la modalidad 93, que comprende las siguientes extensiones del N-terminal en comparación con la sec. con núm. de ident.:1: (q) MS-FGF21, (s) MSGSGSGSGSG-, (t) MGGGGG-, (u) MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-, (v) MSGGGGG-, (x) MSGSGGS-, (y) MSGGSSG- y (z) MSGSGSGSG-; así como también cualquiera de las modalidades (q), (s), (t), (u), (v), (x), (y) y (z) sin la Met del N-terminal.
40

45 159. Un análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que se selecciona a partir de los siguientes: (r) MSGSGSGSGSG-FGF21, (s) MGGGGG-FGF21, (t) MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-FGF21, (u) MSGGGGG-FGF21, (v) MSGSGGS-FGF21, (x) MSGGSSG-FGF21 e (y) MSGSGSG-FGF21, así como también cualquiera de las modalidades (r), (s), (t), (u), (v), (x) y (y) sin la Met en el N-terminal; en donde el FGF21 se refiere a la sec. con núm. de ident.:1.

50 160. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que tiene una P (prolina) en la posición 146, en donde el número de la posición se refiere a la sec. con núm. de ident.:1.

55 161. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que tiene una potencia de al menos 1 %, preferentemente, al menos 5 %, con mayor preferencia al menos 10 %, o con la máxima preferencia al menos 20 % en comparación con la potencia del Met-FGF21, en donde la potencia se determina mediante la medición de la captación de la glucosa en los adipocitos 3T3-L1.

60 162. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, en donde la potencia es al menos 30 %, preferentemente, al menos 40 %, con mayor preferencia al menos 50 %, incluso con mayor preferencia al menos 60 %, o con la máxima preferencia al menos 70 %, en comparación con la potencia del Met-FGF21.

163. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, en donde la potencia es (i) al menos 80 %, preferentemente, al menos 90 %, con mayor

preferencia al menos 100 %, incluso con mayor preferencia al menos 110 %, o con la máxima preferencia al menos 120 %, con respecto a la potencia del Met-FGF21; (ii) al menos 100 %, preferentemente, al menos 120 %, con mayor preferencia al menos 140 %, incluso con mayor preferencia al menos 160 %, o con la máxima preferencia al menos 180 %, en comparación con la potencia del Met-FGF21; o (iii) al menos 200 %, preferentemente, al menos 250 %, con mayor preferencia al menos 300 %, incluso con mayor preferencia al menos 350 %, o con la máxima preferencia al menos 400 %, relativa a la potencia del Met-FGF21.

164. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, en el que la potencia se determina como se describe en cualquiera de las modalidades 70-75.

165. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que es capaz de disminuir la glucosa en sangre en los ratones db/db relativo a un control de vehículo.

166. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, en donde la glucosa en sangre disminuye en al menos 1 %, preferentemente, en al menos 2 %, con mayor preferencia en al menos 3 %, incluso con mayor preferencia en al menos 4 %, o con la máxima preferencia en al menos 5 %, en base a la media de la glucosa en sangre medida en mM y relativa a un control de vehículo correspondiente.

167. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, en donde (i) los ratones db/db son machos y de 9-11 semanas de edad, (ii) el análogo se administra s.c., (iii) la dosificación del análogo está en el intervalo de 0,1-1,0 mg/kg, preferentemente, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 o 1,0 mg/kg, (iv) el análogo se administra una vez al día, preferentemente, en el día 1, día 2 y día 3, y/o (v) la glucosa en sangre se mide mediante el uso del método de la glucosa oxidasa, preferentemente, mediante el uso de un analizador de glucosa tal como Biosen 5040.

168. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que es más estable que el Met-FGF21 después de la oxidación por la incubación en presencia de H₂O₂ 300 mM durante 1 hora a 25 °C.

169. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, en el que la estabilidad se refiere a la potencia, determinada de acuerdo con cualquiera de las modalidades 70-75.

170. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que después de la incubación con H₂O₂ tiene una potencia de al menos 15 %, preferentemente, al menos 20 %, con mayor preferencia al menos 30 %, incluso con mayor preferencia al menos 40 %, o con la máxima preferencia al menos 50 %, en donde la potencia es relativa al Met-FGF21 tratado de la misma manera, pero entonces sin H₂O₂.

171. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que comprende las siguientes modificaciones en comparación con el FGF21 (sec. con núm. de ident.:1): (i) Met-Gly- en el N-terminal, (ii) M168L, (iii) modalidad (i) y (ii), (iv) Met-Cys- en el N-terminal, (v) Gly- en el N-terminal, (vi) modalidad (v) y (ii), (vii) Met-Ser- en el N-terminal, o (viii) Ser- en el N-terminal; preferentemente, el análogo del FGF21 se selecciona a partir de los siguientes: (l) Met-Gly-FGF21, (m) Met-Gly-FGF21-M168L, (n) Met-Cys-FGF21, (o) Gly-FGF21-M168L, (p) Gly-FGF21, (q) Met-Ser-FGF21, o (r) Ser-FGF21; en donde FGF21 se refiere al polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1.

172. El análogo del FGF21, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, que tiene una P (prolina) en la posición 146, en donde el número de la posición se refiere a la sec. con núm. de ident.:1.

173. El análogo del FGF, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores de los análogos del FGF, a la medida de lo posible, que es cualquiera de los análogos específicos mencionados en los ejemplos anteriores 2 (es decir, 2a-2af), 56 (es decir, 56a-56as) y 57.

174. Una composición que comprende un análogo de cualquiera de las modalidades anteriores de los análogos o un derivado de cualquiera de las modalidades anteriores de los derivados, y un portador farmacéuticamente aceptable.

175. Un análogo, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, preferentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 141-173, un derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los derivados, a la medida de lo posible, preferentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-140, o una composición de la modalidad 174, para usar como un medicamento.

176. Un análogo, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, preferentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 141-173, un derivado de cualquiera de las modalidades 1-140, o una composición de la modalidad 174, para usar como un medicamento en el tratamiento o la prevención de la diabetes, la dislipidemia, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, el síndrome metabólico, y/o la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD).

177. Un análogo, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los análogos, a la medida de lo posible, preferentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 141-173, un derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores relativas a los derivados, a la medida de lo posible, preferentemente, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-140, o una composición de la modalidad 174, para usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la diabetes, la dislipidemia, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, el síndrome metabólico, y/o la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD).

178. Un método para tratar un paciente que exhibe diabetes, dislipidemia, obesidad, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, y/o Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD) que comprende administrarle al paciente una cantidad con eficacia terapéutica de un análogo de cualquiera de las modalidades 141-173, un derivado de cualquiera de las modalidades 1-140, o una composición farmacéutica de la modalidad 174.

179. Un método para tratar un paciente que necesita cuidados intensivos que comprende la administración al paciente de una cantidad con eficacia terapéutica de un análogo de cualquiera de las modalidades 141-173, un derivado de cualquiera de las modalidades 1-140, o una composición farmacéutica de la modalidad 174.

180. Cualquier combinación novedosa de las modalidades, características y reivindicaciones descritas en la presente descripción.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Abreviaturas

Las siguientes abreviaturas se utilizan en orden alfabético a continuación: DCM es diclorometano, DIC es diisopropilcarbodiimida, DIPEA es diisopropiletilamina, DPBS es solución salina de Dulbecco tamponada con Fosfato, DVB es divinil benceno, EDAC es (3-di-metilamino-propil) etil carbodiimida hidrocloreuro, Fmoc es 9H-fluoren-9-ilmetoxi-carbonil, HEPES es ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico, HOAt es 1-hidrox-7-azabenzotriazol, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPβCD es Hidroxipropil Beta Ciclodextrina, HPLC es Cromatografía Líquida de Alto Flujo, IBMX es 3-isobutil-1-metilxantina, Inp es ácido isonipecóico, IPTG es isopropil β-D-1-tiogalacto-piranosido, LCMS es Espectroscopía de Masa Unida a Cromatografía Líquida, MALDI-TOF MS es Espectroscopía de Masa desorción/ionización Láser Asistida por Matriz con analizador Tiempo de Vuelo, MeOH es metanol, NanoES-MS es Espectrometría de Masa en tándem por NanoElectroaspersión, NMP es 1-metil-pirrolidin-2-ona, OEG es ácido 8-amino-3,6-dioxaoctánico, OtBu es tertbutil éster, PBS es solución salina tamponada con fosfato, RT es temperatura ambiente, TFA es ácido trifluoroacético, THF es tetrahidrofuran, TIPS es triisopropilsilano, Tris es tris(hidroximetil)aminometano o 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol, Trx es ácido tranexámico, TSTU es O-(N-succimidil)-N,N',N'-tetra-metil-uronio tetrafluoroborato y UPLC es Cromatografía Líquida Ultra Rápida.

Métodos generales

Método LCMS 1 (LCMS1)

Se usó un espectrómetro de masas LC/MSD TOF de Agilent Technologies (G1969A) para identificar la masa de la muestra después de la elución de un sistema de HPLC Agilent serie 1200. La deconvolución de los espectros de proteínas se calculó con el programa informático de confirmación de proteínas de Agilent.

Eluyentes:

A: Ácido trifluoroacético 0,1 % en agua

B: Ácido trifluoroacético 0,1 % en acetonitrilo

Columna: Zorbax 5u, 300SB-C3, 4,8x50 mm

Gradiente: 25 % - 95 % acetonitrilo durante 15 minutos

Método LCMS 2 (LCMS2)

Se usó un espectrómetro de masas API 3000 de Perkin Elmer Sciex para identificar la masa de la muestra después de la elución de un sistema de HPLC de Perkin Elmer Series 200.

5 Eluyentes:

A: Ácido trifluoroacético 0,05 % en agua

B: Ácido trifluoroacético 0,05 % en acetonitrilo

10

Columna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 µm

Gradiente: acetonitrilo 5 % - 90 % durante 7,5 minutos a 1,5 mL/minuto

15 Método LCMS 3 (LCMS3)

Se usó un espectrómetro de masas Waters Micromass ZQ para identificar la masa de la muestra después de la elución de un sistema de HPLC Waters Alliance HT.

20 Eluyentes:

A: Ácido trifluoroacético 0,1 % en agua

B: Ácido trifluoroacético 0,1 % en acetonitrilo

25

Columna: Phenomenex, Jupiter C4 50 X 4,60 mm id 5 µm

Gradiente: 10 % - 90 % B durante 7,5 minutos a 1,0 ml/minuto

Ejemplo 1: Clonación y expresión del FGF21

30

El ADN y la secuencia de aminoácidos para el FGF21 humano se describió por, por ejemplo, Nishimura y otros en *Biochim. Biophys. Acta* 1492(1):203-206 (2000). Las secuencias están disponibles, además, desde las bases de datos públicas con núms. de acceso EMBL:AB021975 y UNIPROT:Q9NSA1, respectivamente.

35 El polipéptido natural se sintetiza con un péptido señal de 28 aminoácidos para la secreción:

40

45
1 MDSDETGF~~FEH~~ SGLWVS~~VL~~AG LLLGACQ~~AHP~~ IPDSSPLLQF GGQVRQRYLY
51 TDDAQQT~~EAH~~ LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR
101 FLCQRPD~~GAL~~ YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK
151 SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS
50 201 QGRSPSYAS

55 El péptido señal, mostrado en letras itálicas anteriormente, se incluye en la secuencia adjunta que se enumera como la sec. con núm. de ident.:2. El polipéptido maduro del FGF21 que consiste en los restantes 181 aminoácidos se incluye en la secuencia que se enumera como la sec. con núm. de ident.:1.

60 El polipéptido maduro del FGF21 se clonó y se expresó como una proteína intracelular en *E. coli*, sin el péptido señal, pero con una metionina añadida en el N-terminal. Más en particular, una región codificante de 550 pb que incluye en el extremo 3' el codón ATG para la Met, así como también los sitios de restricción Nde1 y BamH1 en los extremos 3' y 5', respectivamente, se insertó en el vector de expresión pET 11c en Nde1-BamH1 bajo el control del promotor del fago T7, y se usó para transformar células de *E. coli* B BL21(DE3). Las células crecieron en LB amp 100 µg/mL hasta una DO₄₅₀ de 0,5, y se indujo la expresión con IPTG 0,3 mM durante 4 horas a 37 °C. Para el análisis de la expresión del FGF21 se hicieron extractos crudos de células mediante sonicación.

65

Un SDS-PAGE teñido con Coomassie demostró la expresión exitosa del FGF21 que se identificó principalmente en la fracción del sobrenadante soluble, con muy poco en el gránulo insoluble. A pesar de que la MW del FGF21 (Met-FGF21) (Compuesto A) así expresado es de 19,5 kD, este migra en el gel como una proteína de 25 kD, lo que se debe, probablemente, al alto contenido en prolinas, que retardan el movimiento de la proteína.

Ejemplo 2: Clonación y expresión de los análogos del FGF21

Los siguientes 12 análogos del Met-FGF21 se diseñaron como es conocido en la técnica y se expresaron en *E. coli* como se describe, generalmente en el Ejemplo 1 o en *S. cerevisiae* mediante el uso de métodos similares:

2a) K122C Met-FGF21 (Compuesto B),

2b) (K59R, K69R, K122R) Met-FGF21 (Compuesto C),

2c) (K56R, K69R, K122R) Met-FGF21 (Compuesto D),

2d) (K56R, K59R, K69R) Met-FGF21 (Compuesto G),

2e) S71C Met-FGF21 (Compuesto E),

2f) (K56R, K59R, K69R, K122R) Met-FGF21 (Compuesto S),

2g) (K56R, K59R, K69R, K122R, I152K) Met-FGF21 (Compuesto R),

2h) D102T Met-FGF21 (Compuesto M),

2i) A26E Met-FGF21 (Compuesto N),

2j) (Q28R, A31E) Met-FGF21 (Compuesto P),

2k) Q27E Met-FGF21 (Compuesto Q), y

2l) M168L Met-FGF21 (Compuesto K).

Aún 3 análogos adicionales del Met-FGF21 que se prepararon incluyen los siguientes:

2m) (179F, 180E, 181R) Met-FGF21 (Compuesto X),

2n) (169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) Met-FGF21 (Compuesto Y), y

2o) (166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) Met-FGF21 (Compuesto Z).

Los siguientes 2 análogos del FGF21 se prepararon, además, como se describió anteriormente:

2p) Gly-FGF21-M168L (Compuesto J) y

2q) Gly-FGF21 (Compuesto I).

Aún 14 análogos adicionales del FGF21 que se prepararon como se describió anteriormente son los siguientes:

2r) S6C-Met-FGF21,

2s) (L118C-A134C, K56R, K59R, K69R, K122R)-Met-FGF21,

2t) (S6K, K56R, K59R, K69R, K122R)-Met-FGF21,

2u) Met-Gly-FGF21,

2v) Met-Gly-FGF21-M168L,

2x) Met-Cys-FGF21,

2y) Met-Ser-FGF21,

2z) (r) MSGSGSGSGSG-FGF21,

2aa) (s) MGGGGG-FGF21,

2ab) (t) MSHSGSGSGSGSGSGSGSGSG-FGF21,

2ac) (u) MSGGGGG-FGF21,

2ad) (v) MSGSGGS-FGF21,

2ae) (x) MSGGSSG-FGF21, e

2af) (y) MSGSGSG-FGF21.

Ejemplo 3: Purificación del FGF21 y análogos

El polipéptido FGF21 y sus análogos preparados como se describe en los Ejemplos 1-2 se purificaron adicionalmente de la siguiente manera o mediante el uso de técnicas similares:

Una suspensión de *E. coli* (20 % p/v) en tampón fosfato de potasio 10 mM pH 7,5 se le aplicó ultrasonido (3 segundos en intervalos encendido/apagado en hielo durante 5 minutos). El polipéptido se sedimentó mediante centrifugación (10 000 x g, durante 30 minutos), se volvió a solubilizar mediante sonicación en Tris 50 mM, pH 8,0, y los desechos se eliminaron mediante centrifugación (10 000 x g, durante 30 minutos). El polipéptido en el sobrenadante resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 50-250 mM) mediante el uso de resina de Flujo Rápido Q Sepharose (GE Healthcare), como se describe generalmente en *Protein Purification*. Principles y Practice Series: Springer Advanced Texts in Chemistry Scopes, Robert K. 3ra ed., 1994. En algunos ejemplos, la purificación adicional se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de una columna HiLoad 26/60 Superdex pg 75 (GE Healthcare) que se hizo funcionar con Tris 50 mM pH 8,0 y NaCl 200 mM. Para el almacenamiento, el polipéptido se transfirió a bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7,9, se liofilizó y se mantuvo a -80 °C.

Ejemplo 4: Derivatización de compuestos del FGF21 en Cys con aglutinantes de albúmina

Los aglutinantes de albúmina que contienen una maleimida pueden sintetizarse como se describe a continuación, y el FGF21 y sus análogos que contienen una cisteína libre pueden derivarse con tales aglutinantes de albúmina como se describe, además, a continuación.

Preparación del ácido 17-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-({2-[2-({3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-etilcarbamoil}-metoxi)-etoxil]-etilcarbamoil}-metoxi)-etoxil]-etilcarbamoil}-propilcarbamoil)-heptadecanoico

Etapas 1: Resina Fmoc-etilendiamina 2-clorotritilo:

5,8 g (7,5 mmol) de la resina de cloruro de 2-clorotritilo (100-200 malla, 1 % DVB, cargado 1,3 mmol/g) se hinchó en DCM (80 mL) durante 1 hora y después se drenó. El cloruro hidrógeno Fmoc-etilendiamina se suspendió en NMP (30 mL) y DCM (30 mL) y DIPEA (5 eq, 6,42 mL). Esta suspensión se añadió a la resina y se agitó durante 3 horas. La resina se drenó y se lavó con 17:2:1, DCM:MeOH:DIPEA, DCM, NMP y DCM (3 x 80 mL). Esta se secó sobre un desecador KOH/NaOH.

Etapas 2: Resina Fmoc-OEG-etilendiamina 2-clorotritilo:

3 mmol de la resina Fmoc-etilendiamina 2-clorotritilo se modificó mediante el uso de un sintetizador de péptido de microondas CEM Liberty y la metodología de péptidos de fase sólida basada en Fmoc. La resina se hinchó en NMP (60 mL) y se drenó.

La resina se desprotegió de Fmoc mediante el uso de piperidina 5 % en NMP (60 mL), calentada durante 30 segundos, drenada, lavada con NMP (60mL), seguido de piperidina 5 % en NMP (60 mL) adicional, calentada durante 3 minutos a 70-75°C, seguido por el lavado con NMP (4x60 mL). Una solución de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctánico 0,3 M + HOAt 0,3 M en NMP (45 mL) se añadió a la resina seguido de la adición de una solución de DIC 0,75 M en NMP (18 mL). La reacción se calentó hasta 70-75°C durante 10 minutos, seguido de un lavado con NMP (4x60 mL).

Etapas 3: Resina Fmoc-OEG-OEG-etilendiamina 2-clorotritilo:

La resina se desprotegió de Fmoc mediante el uso de piperidina 5 % en NMP (60 mL), calentada durante 30 segundos, drenada, lavada con NMP (60mL), seguido de piperidina 5 % en NMP (60 mL) adicional, calentada durante 3 minutos a 70-75°C, seguido por el lavado con NMP (4x60 mL). Una solución de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctánico 0,3 M + HOAt 0,3 M en NMP (45 mL) se añadió a la resina, seguido de la adición de una solución de

DIC 0,75 M en NMP (18 mL). La reacción se calentó hasta 70-75°C durante 10 minutos, seguido de un lavado con NMP (4x60 mL).

Etapas 4: Resina Fmoc-gamma-Glu-OEG-OEG-etilendiamina 2-clorotritilo:

La resina se desprotegió de Fmoc mediante el uso de piperidina 5 % en NMP (60 mL), calentada durante 30 segundos, drenada, lavada con NMP (60mL), seguido de piperidina 5 % en NMP (60 mL) adicional, calentada durante 3 minutos a 70-75°C, seguido por el lavado con NMP (4x60 mL). Una solución de ácido Fmoc-Glu-OtBu 0,3 M + HOAt 0,3 M en NMP (45 mL) se añadió a la resina, seguido de la adición de una solución de DIC 0,75 M en NMP (18 mL). La reacción se calentó hasta 70-75°C durante 10 minutos, seguido de un lavado con NMP (4x60 mL).

Etapas 5: Resina C18-diacid-gamma-Glu-OEG-OEG-etilendiamina 2-clorotritilo:

La resina se desprotegió de Fmoc mediante el uso de piperidina 5 % en NMP (60 mL), calentada durante 30 segundos, drenada, lavada con NMP (60mL), seguido de piperidina 5 % en NMP (60 mL) adicional, calentada durante 3 minutos a 70-75 °C, seguido por el lavado con NMP (4x60 mL). Una solución de ácido octadecanodioico mono-tert-butil éster 0,3 M + HOAt 0,3 M en NMP (45 mL) se añadió a la resina, seguido de la adición de una solución de DIC 0,75 M en NMP (18 mL). La reacción se calentó hasta 70-75 °C durante 10 minutos, seguido de un lavado con NMP (4x60 mL).

Etapas 6: Ácido 17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(2-amino-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-1-carboxi-propilcarbamoil]-heptadecanoico:

La resina se trató con TFA/TIPS/agua 95:2,5:2,5 durante 1 hora. La resina se filtró y el filtrado se concentró al vacío. Se adicionó acetonitrilo y la muestra se concentró nuevamente. El producto crudo se purificó mediante HPLC (acetonitrilo 10-50 %, TFA 0,1 %, 60 mL/minutos, C18, 50mmx200mm, 15Å)

LCMS2 m/z: 777 (M+1).

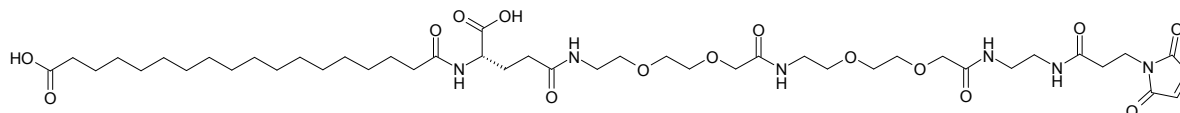
Etapas 7: Ácido 17-[(S)-1-carboxi-3-{2-[2-[(2-{2-[(2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil]-heptadecanoico:

N-maleoil-beta-alanina (0,65 mmol, 110 mg) se disolvió en NMP. Se adicionaron EDAC (0,65 mmol, 125 mg) y HOBt (0,65 mmol, 88 mg), y la mezcla se agitó durante 1 hora a RT. Se adicionó una solución de ácido 17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(2-amino-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-1-carboxi-propilcarbamoil]-heptadecanoico (0,65 mmol, 504 mg) en NMP (5 mL), y la mezcla se agitó durante 16 horas a RT. El producto crudo se purificó mediante HPLC (acetonitrilo 25-65 %, TFA 0,1 %, 60 mL/minutos, C18, 50mmx200mm, 15Å) para proporcionar 200 mg del compuesto del título.

LCMS2 m/z: 927,8 (M+1).

Preparación del derivado K122C Met-FGF21 S-122-[1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi]-etoxi]-acetilamino]-etoxi]-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoil)-etil)-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys122] Met-FGF21 (Compuesto F)

El residuo Cys en la posición 122 en el análogo K122C Met-FGF21, preparado como se describe en los Ejemplos 2 y 3 (sec. con núm. de ident.:1 con K122C y una M en el N-terminal), se modificó en el grupo tiol con el siguiente reactivo, que se preparó como se describió anteriormente:



[Cys122]-Met-FGF21 (liofilizado) se disolvió en tampón Tris 20 mM pH 7,5 y el tampón se cambió para tampón Tris 20 mM mediante el uso de columnas PD-10 (GE Healthcare 170851-01). A 7 mL (1,48 µmol) de esta solución (4,1 mg/mL) se adicionaron 1,5 mL de una solución que contiene ácido 17-[(S)-1-carboxi-3-{2-[2-[(2-{2-[(2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil]-heptadecanoico en tampón acetonitrilo/Tris (1,3:1) (2,96 µmol). La reacción se dejó reaccionar a RT durante 1 hora. La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se purificó mediante el uso de una cromatografía de exclusión por tamaño (GE Healthcare, Superdex 200, 26/60) que eluyó con tampón Tris 20 mM pH 7,5, seguido de cromatografía de intercambio iónico (Mono-Q 5/50, gradiente de NaCl 0-0,5 M en Tris 20 mM, pH 7,5 sobre 60 volúmenes de columna). Después del análisis por LCMS y SDS-PAGE las fracciones relevantes se agruparon y se cambió el tampón para NH₄HCO₃ 50 mM y se liofilizó.

LCMS1: Masa teórica = 20 442,2 encontrada 20 442,3

Ejemplo 5: Preparación de otro derivado Cys de un análogo del FGF21

5 Preparación del derivado S71C Met-FGF21 S-71-[1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi]-etoxi]-acetilamino]-etoxi]-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoil]-etil)-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys71] Met-FGF21 (Compuesto H)

10 Preparación del ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico

Etapla 1: ácido 19-((S)-1-tert-Butoxicarbonil-3-[2-(2-((2-[2-(2-carboximetoxi-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-propilcarbamoil)-nonadecanoico tert-butil éster:

15 A una solución de ácido 2-(19-tert-Butoxicarbonilnonadecanoilamino) pentanodioico 1-tert-butil éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster (2,50 g) y ácido [2-(2-{2-[2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi]-etoxi]-acético (1,47 g) en etanol (40 mL) se adicionó DIPEA (1,26 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y después se concentró al vacío. Al residuo se le añadió HCl 0,1 N acuoso (150 mL) y acetato de etilo (200 mL). Las
20 capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron (sulfato de magnesio) y se concentraron al vacío para proporcionar un aceite, que cristalizó en reposo. Rendimiento 96 % (3,1 g). LCMS3: Masa teórica: 874,2. Encontrado: 874,49.

25 Etapla 2: ácido 19-((S)-1-tert-Butoxicarbonil-3-[2-(2-((2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico tert-butil éster:

A una solución de ácido 19-((S)-1-tert-Butoxicarbonil-3-[2-(2-((2-[2-(2-carboximetoxi-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-propilcarbamoil)-nonadecanoico tert-butil éster (3,1 g) en acetonitrilo (50 mL) se adicionaron TSTU (1,39 g) y DIPEA (0,91 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y después se concentró al vacío. Al residuo se le añadió HCl (100 mL) 0,1 N acuoso y acetato de etilo (200 mL). Las capas se separaron y la
30 capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron (sulfato de magnesio) y se concentraron al vacío para proporcionar un aceite. Rendimiento 99 % (3,4 g).

35 LCMS3: Masa teórica: 971,2 Encontrado: 971,8.

Etapla 3: ácido 19-((S)-1-carboxi-3-[2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil]-propilcarbamoil)-nonadecanoico:

40 El ácido 19-((S)-1-tert-Butoxicarbonil-3-[2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico tert-butil éster (3,4 g) se agitó en TFA (75 mL) durante 45 minutos y después se concentró al vacío. El residuo se concentró con tolueno 3 veces para proporcionar un sólido. El residuo se cristalizó en 2-propanol y se filtró para proporcionar un compuesto cristalino blanco. Rendimiento 80 % (2,4 g). LCMS3: Masa teórica: 859,03 Encontrado: 859,44.

45 Etapla 4: Ácido 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il) propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster:

El ácido malimidopropiónico (500 mg) se disolvió en THF anhidro (15 mL). Se adicionaron TSTU (790 mg) y DIPEA (0,62 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Se concentró la suspensión espesa amarilla. El residuo se disolvió en DCM y se extrajo con HCl 0,1 N (2x) y salmuera (1x). La capa orgánica se
50 secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar un sólido blanco.

LCMS3: Masa teórica: 266,21 Encontrado: 267,26 (M+1).

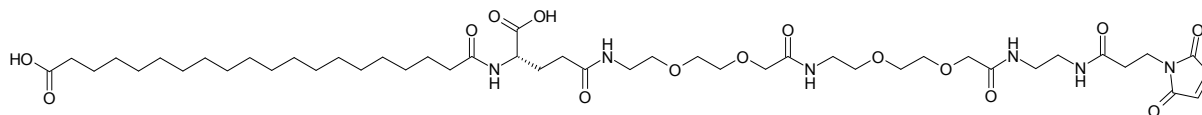
55 Etapla 5: Ácido 19-((S)-1-carboxi-3-[2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico:

A una solución de N-butoxicarbonil etilendiamina (70 mg) en acetonitrilo (4 mL) se adicionó DIPEA (0,07 mL) y se adicionó ácido 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il) propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster (100 mg). Después de agitar durante 1 hora, la mezcla se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DCM y se lavó con ácido cítrico al 5 %, se
60 secó con sulfato de magnesio y se concentró. Al residuo se le adicionó TFA (8 mL). Después de agitar durante 1 hora a RT, la mezcla se concentró al vacío y se concentró conjuntamente con tolueno, dos veces. El residuo se disolvió en THF (5 mL). Se adicionaron ácido 19-((S)-1-carboxi-3-[2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico (75 mg) y DIPEA (0,09 mL). La mezcla se agitó a RT durante la noche. Purificación por HPLC mediante el uso del tampón A: TFA 0,1 % en
65 agua y tampón B: TFA 0,1 % en acetonitrilo. Gradiente 10-80 % B durante 45 minutos. Flujo: 20 mL/minuto, columna

C18 30mmx250mm, 110Å. Rendimiento 116 mg (34 %).

LCMS3: Masa teórica: 955,17 Encontrado: 955,7

- 5 El residuo Cys en la posición 71 en el análogo S71C Met-FGF21, preparado como se describió generalmente en los Ejemplos 2 y 3 (sec. con núm. de ident.:1 con S71C y una M en el N-terminal), se modificó en el grupo tiol la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



- 10 [Cys71] Met-FGF21 (1,68 mg, 85,9 nmol) liofilizado a partir de NH_4HCO_3 se disolvió en agua MiliQ (1 mL). El tampón se cambió para Tris 0,02 M, pH 7,8 en una columna PD 10 (GE healthcare 179851-01). Se recolectó un eluato de aproximadamente 3,5 mL. A este eluato se adicionó ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-((2-[3-(2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propionilamino]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico (0,86 μmol) en Tris 0,02 M, pH 7,8 / acetonitrilo 1:1 (0,205 mL). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora y después a 5 °C durante la noche. Purificación mediante intercambio iónico en una columna monoQ 5/50 GL mediante el uso del tampón A: Tris 20 mM, pH 7,8; Tampón B: Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,8, flujo 0,5 mL y un gradiente de 0-100 % B sobre 20CV. Las fracciones aisladas que contenían el producto se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño en un grado de preparación HiLoad 26/60 superdex 200 en tampón DPBS de Bio Whittaker. Rendimiento 0,466 g.

LCMS1: Masa teórica: 20 511,3 Encontrado: 20 511,3

Ejemplo 6: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

- 25 Preparación del derivado S71C Met-FGF21 S-71-((2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoil)-metil) [Cys71] Met-FGF21 (Compuesto O)

- 30 Preparación del ácido 9-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-((2-[2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico
Etapa 1: Ácido 19-((S)-3-(2-{2-[2-(2-[2-(2-amino-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-1-tert-butoxicarbonil-propilcarbamoil)-nonadecanoico tert-butil éster:

- 35 A una solución de ácido 19-((S)-1-tert-butoxicarbonil-3-{2-[2-((2-[2-(2-carboximetoxi-etoxi)-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico tert-butil éster (500 mg) en acetonitrilo (15 mL) se adicionó TSTU (224 mg) y DIPEA (0,13 mL). Después de agitar durante 2 horas a RT esta mezcla se vertió en una solución de etilendiamina (0,50 mL) en acetonitrilo (5 mL). Después de agitar durante 2 horas la mezcla se concentró al vacío. El residuo se agitó en NaOH 1 N (100 mL) y etil acetato (400 mL). Las capas se separaron. La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio y se concentró al vacío para proporcionar un sólido blanco. Este sólido se agitó en etanol y después se filtró. El filtrado se concentró para proporcionar un jarabe. Rendimiento 250 mg (48 %)
LCMS3: Masa teórica: 916,26 Encontrado: 916,7

- 45 Etapa 2: Ácido 19-((S)-1-tert-butoxicarbonil-3-{2-[2-((2-[2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico tert-butil éster:

- A una solución de ácido yodoacético (60 mg) en DCM (8 mL) se adicionó TSTU (90 mg) y DIPEA (0,05 mL). Después de agitar a RT durante 60 minutos, se adicionó una solución de ácido 19-((S)-3-(2-{2-[2-(2-[2-(2-amino-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-1-tert-butoxicarbonil-propilcarbamoil)-nonadecanoico tert-butil éster (0,25 g) en DCM (8 mL) y DIPEA (0,05 mL). Después de agitar durante 120 minutos, la mezcla se diluyó con DCM (100 mL) y se adicionó HCl 1 N (50 mL). Las capas se separaron. La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio y se concentró al vacío. El residuo se concentró conjuntamente con etanol para proporcionar un compuesto sólido. Rendimiento 225 mg (76 %).

- 55 LCMS3: Masa teórica: 1 084,2 Encontrado: 1 084,8

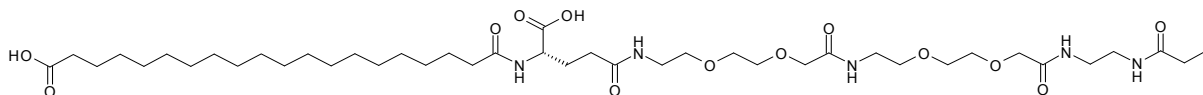
Etapa 3: Ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-((2-[2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico:

- 60 El ácido 19-((S)-1-tert-butoxicarbonil-3-{2-[2-((2-[2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil)-propilcarbamoil)-nonadecanoico tert-butil éster (225 mg) se trató con TFA

(10 mL) durante 90 minutos. La mezcla se concentró al vacío y se concentró conjuntamente con tolueno dos veces. El residuo se purificó por HPLC mediante el uso de un tampón A: TFA 0,1 % en agua y tampón B: TFA 0,1 % en acetonitrilo. Gradiente 10-80 % B durante 45 minutos. Flujo: 20 mL/minuto, columna C18 30mmx250mm, 110Å. Rendimiento 45 mg (22 %).

LCMS3: Masa teórica: 971,98 Encontrado: 972,6

El residuo de Cys en la posición 71 en el análogo S71C Met-FGF21, preparado como se describe generalmente en los Ejemplos 2 y 3 (sec. con núm. de ident.:1 con S71C y una M en el N-terminal), se modificó en el grupo tiol con el siguiente reactivo:



Procedimiento General A

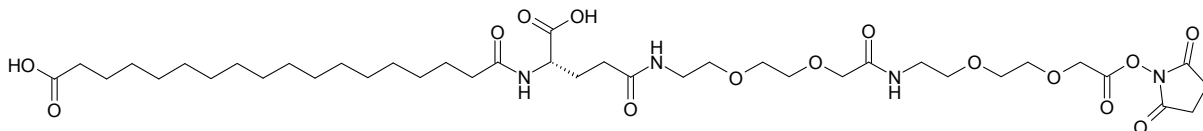
[Cys71] Met-FGF21 (7,53 mg, 385 nmol), liofilizado a partir de NH_4HCO_3 , se disolvió en 3x350 μL de Tris 0,02 M, pH 7,8, y el tampón se cambió a través de columnas PD 10 a Tris 0,02M, pH 7,8. Aproximadamente se recolectaron 3,5 mL. El ácido 19-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-((2-(2-yodoacetilamino)etilcarbamoil)-metoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-propilcarbamoil)-nonadecanoico (1,5 mg), que se preparó como se describió anteriormente, se disolvió en tampón Tris 0,02 M, pH 7,8 /acetonitrilo 1:1 (0,75 mL). A la solución de [Cys71] Met-FGF21 se adicionó una solución de yodo acetamida (0,561 mL, 3eq). La concentración de acetonitrilo fue del 7 %. La mezcla se dejó a RT durante 70 horas. La mezcla se ultrafiltró en el dispositivo de centrifuga Amicon Ultra-4 MWCO de 10000 a 4000 g durante 10 minutos. La ultrafiltración con aproximadamente 4 mL de tampón A se repitió durante otras 4 veces para eliminar el reactivo. La muestra se purificó mediante intercambio aniónico en una columna monoQ 5/50 GL mediante el uso del tampón A: TRIS 20 mM, pH 7,8; tampón B: TRIS 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,8, flujo 0,5 mL y un gradiente de 0-100 % B sobre 60CV. Las fracciones aisladas que contenían el producto se agruparon y se concentraron mediante ultracentrifugación en el dispositivo centrifuga Amicon Ultra-4 MWCO 10000 a 6000 rpm durante 2 x 10 minutos.

Se realizó un cambio de tampón para NH_4HCO_3 50 mM mediante el uso de columnas PD 10 (GE 179851-01). Se recolectaron, aproximadamente, 4,0 mL del eluato. Este se filtró a través de un filtro Millex GV estéril de 0,22 μm y se liofilizó. Rendimiento 2,18 mg.

LCMS1: Masa teórica: 20 400,2 Encontrado: 20 400,13

Ejemplo 7: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina
Preparación de los derivados Met-FGF21 (K56R, K59R, K69R, K122R) N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino)-etoxi)-etoxi)-acetil] [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Met-FGF21 (Compuesto V)

El residuo de Met en el N-terminal en los análogos del Met-FGF21 K56R, K59R, K69R, K122R, preparado como se describió generalmente en los Ejemplos 2 y 3 (sec. con núm. de ident.:1 con K56R, K59R, K69R, y K122R y una M en el N-terminal), se modificó en el grupo alfa amino con el siguiente reactivo:



El Met-FGF21 [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] (liofilizado) se disolvió en tampón DPBS y el tampón se cambió para tampón DPBS mediante el uso de columnas PD-10 (GE Healthcare170851-01) con un rendimiento de 3,5 mL (4,3 mg/mL, 0,77 μmol). La muestra se diluyó con tampón DPBS (10,5 mL) y se adicionó una solución de ácido 17-((S)-1-carboxi-3-[2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil]-propilcarbamoil)-heptadecanoico (6,2 μmol), que se preparó como se describió generalmente en el Ejemplo 4, en acetonitrilo (7,5 mL). Después de 1 hora a RT, la mezcla se enfrió a 0 °C y se adicionó NaOH 0,2 M (21 mL) frío. Después de 30 minutos a 0 °C la mezcla se neutralizó con ácido clorhídrico. La mezcla se concentró mediante el uso de filtros centrifugos Amicon Centriprep ultracel YM10 (10000 MWCO), después se diluyó con 5 mL de tampón Tris 20 mM, pH 7,5 y se volvió a concentrar dos veces (volumen final aproximadamente 5 mL). La mezcla de la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 μm y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, y se liofilizó como se describió en el Ejemplo 4.

LCMS1: Masa teórica: 20 368,1 Encontrado: 20 367,2

Ejemplo 8: Ensayo de potencia - captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1

- 5 El siguiente ensayo se usó para determinar la actividad biológica, o la potencia, de los compuestos del FGF21 de la invención.

10 Los fibroblastos de ratón 3T3-L1 (por ejemplo, comercializados por la ATCC, núm. de catálogo CL-173) se mantuvieron en medio basal (DMEM (4 500 mg/L Glucosa) con Suero Fetal Bovino (FBS) 10 % y Penicilina/Estreptomicina). No se permite que las células alcancen la confluencia y deben pasarse (transferirse a nuevos viales) antes de alcanzar aproximadamente el 60 % de confluencia (por inspección visual).

15 Para el ensayo de captación de la glucosa, las células se siembran en placas, 80,000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos, o 20,000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, y cuando alcanzan la confluencia (alta densidad, con una visión para diferenciar las células adiposas), se realiza un cambio de medio, de medio basal a medio basal que contiene Troglitazona, IBMX, Dexametasona (comercializado por, por ejemplo, Sigma) e insulina humana (comercializado por, por ejemplo, Novo Nordisk A/S).

20 Las células se usan de 7-14 días, preferentemente, de 7-10 días después de iniciar la diferenciación. Las células se estimulan con concentraciones crecientes (0-300 nM) de los polipéptidos o derivados del FGF21 de la invención durante 20 horas en medio basal. Antes de la adición de 3H-deoxiglucosa (en lo adelante: el trazador) las células se lavan en tampón de ensayo cálido (aproximadamente 37°C) (PBS con $MgCl_2$ 1 mM y $CaCl_2$ 2 mM, HEPES y albúmina de suero humano 0,1 %) y las células se incuban con el trazador durante 1 hora. Esta incubación se termina mediante el lavado, dos veces, en tampón de ensayo enfriado en hielo. Las células se lisan con Tritón X-100 y los lisados se transfieren a una placa de 96 pocillos, se adiciona microscint-40 (comercializado por, por ejemplo, Perkin Elmer) y se contabiliza la cantidad de trazador en un contador TOP (por ejemplo, un contador superior Packard de Perkin Elmer). Se calcula la EC_{50} del polipéptido en cuestión. Los resultados que se muestran en la

25 Tabla 1 más abajo indican la EC_{50} (potencia) de los compuestos del FGF21 de la invención con respecto a la del Met-FGF21.

30 Tabla 1: Potencia de los compuestos del FGF21

Compuesto del Ejemplo número	Compuesto	Captación de glucosa por 3T3-L1 Potencia (%) relativa a Met-FGF21
1	A	100
56h		20
56m		114
56l		198
2i	I	91
56af		8
2p		60
56as	J	9
56ae		10
56am		47
56ao		133
56c		38
47		1
56a		50
46		10
53	T	12
54		25
56g		667
49		111
56b	U	33
48		6
56ab		4
56k		209
56j		341
16		131
56ag		403
15		182

Compuesto del Ejemplo número	Compuesto	Captación de glucosa por 3T3-L1 Potencia (%) relativa a Met-FGF21
56x		27
56r		91
2h	M	106
56ar		46
56z		122
2a	B	57
4	F	52
56ac		520
56ad		700
56s		68
2o	Z	356
56ai		7
2l	K	36
56aj		5
2n	Y	45
56u		14
2m	X	6
56t		5
2i	N	85
2k	Q	72
2j	P	48
2d	G	89
2f	S	45
7	V	19
2g	R	26
2c	D	67
2b	C	130
2		36
2e	E	52
5	H	3
6 & 12	O	6
13		1
14		5
56aa		13
56ah		443
56al		4
56f		600
56i		329
56d		10
55		1
56y		7

De los resultados de la Tabla 1 se evidencia que los compuestos del FGF21 de la invención tienen una potencia aceptable, incluso una potencia muy fina en comparación con la potencia del Met-FGF21.

5

Ejemplo 9: Estabilidad de la oxidación de los compuestos del FGF21

La estabilidad oxidativa de diversos compuestos del FGF21 de la invención se determinó en experimentos acelerados mediante el uso de peróxido de hidrógeno.

10

El compuesto en cuestión, por ejemplo, el Met-FGF21, disuelto en PBS, pH 7,2, a una concentración de 51 μM (1 mg/mL) se incubó durante 1 hora a 25 °C en presencia de H_2O_2 300 mM. El control (Met-FGF21 no oxidado) se trató de la misma manera, pero entonces sin H_2O_2 . Las reacciones se terminaron mediante la desalinización en una columna de filtración en gel (Zeba o Superose 12) equilibrada en PBS.

15

El estado de oxidación y la cinética de los dos residuos de Met (la met del N-terminal en el Met-FGF21 de tipo silvestre, sec. con núm. de ident.:1 con una met en el N-terminal, en lo adelante "Met1", y Met168 en la sec. con núm. de ident.:1, en lo adelante "Met168") se determinó por mapeo peptídico mediante el uso de la digestión enzimática con tripsina (ver, por ejemplo, Patten, SMV y otros, Journal of biological chemistry, 274, 10268-10276, 1999), con una relación enzima:sustrato (es decir, tripsina:FGF21) de 1:100 (p/p) durante 2-18 horas a 37 °C. Las digestiones resultantes se inactivaron con TFA 1% y se mapearon mediante UPLC de fase inversa (Waters) en una columna C18. La elución del péptido se controló mediante absorbancia a 214 nm. Los péptidos se recolectaron, se secaron en una centrífuga al vacío y se reconstituyeron en acetonitrilo al 50 % y ácido fórmico al 0,1 %. La espectrometría de masas de los péptidos recolectados, los productos digeridos y la proteína intacta se realizó mediante el uso de MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, autoflex II, ToF/ToF) y NanoES-MS (Q-ToF Ultima, Waters) mediante el uso de capilares de pulverización NanoES.

El análisis por UPLC de las muestras de Met-FGF21 oxidadas y no oxidadas demostró la oxidación completa de los residuos Met1 y Met168 a Met-S-óxido (sulfóxido) en las digestiones expuestas a H₂O₂ 300 mM (1 hora, 25 °C). El análisis mediante MALDI de los péptidos recolectados confirmó que los sitios de oxidación de los péptidos que contienen Met1 y Met168 y los residuos de Met se mostraron oxidados a Met-S-óxido mediante el uso de la secuenciación MS/MS de los péptidos. Mediante el análisis MALDI y UPLC se observaron cinéticas de oxidación similares de los dos residuos en presencia de diversas concentraciones de H₂O₂ (25, 50, 100, 200, y 300 mM incubados durante 30 minutos a 0 °C). La vida media determinadas por UPLC para los péptidos 1-18 y los péptidos 137-176 fueron 36.3 y 40,3 minutos, respectivamente. Además, los productos de la oxidación se observaron por análisis directo de la proteína intacta mediante el uso de NanoES-MS.

La actividad del Met-FGF21 oxidado disminuyó un 10 % en comparación con el Met-FGF21 no oxidado en el ensayo de células adiposas del Ejemplo 8.

De manera similar, se determinó la estabilidad de la oxidación de diversos compuestos del FGF21 de la invención, y los resultados se muestran en la Tabla 2 más abajo. Las condiciones de oxidación fueron H₂O₂ 300 mM, 1 hora, 25 °C.

Tabla 2: Potencia de los compuestos del FGF21

Compuesto de FGF21	EC ₅₀ relativa a la EC ₅₀ de Met-FGF21 (%)
Met-FGF21 (control) (Compuesto A)	100
Met-FGF21 + Oxidación	10
Gly-FGF21	88
Gly-FGF21-M168L	60
Met-FGF21-M168L (Compuesto A1)	36

Ejemplo 10: Evaluación in vivo de los compuestos del FGF21 – farmacodinámica

El ratón db/db es un modelo de ratón para la diabetes Tipo 2. Los ratones carecen del receptor de leptina y se caracterizan por hiperglicemia, resistencia a la insulina, hiperfagia y obesidad.

Se usaron ratones db/db machos (de 9-11 semanas de edad) para medir el efecto sobre la concentración de la glucosa en sangre de los siguientes compuestos del FGF21: (1) FGF21 de tipo silvestre (sec. con núm. de ident.:1 con una Met en el N-terminal), (2) el análogo del FGF21, K122C, con una Met en el N-terminal, derivatizado en la Cys122 con un aglutinante de albúmina como se describe en el Ejemplo 4 (en dos dosificaciones), y (3) el análogo del FGF21, S71C, con una Met en el N-terminal, derivatizado en la Cys71 con un aglutinante de albúmina como se describe en el Ejemplo 6. Los análogos se expresaron en E. coli como se describió en los Ejemplos 1-2 y se purificaron como se describió en el Ejemplo 3.

Los compuestos se administraron s.c. 0,2-1,0 mg/kg en PBS una vez al día (administración en el día 1, día 2 y día 3). El grupo tratado con vehículo (control) se trató con PBS, (250 µl/50 g de ratón) s.c. una vez al día. Los niveles de glucosa en sangre se midieron los días 0, 1, 3, 4 y 5 mediante el uso de un analizador de glucosa (Biosen 5040) basado en el método de la glucosa oxidasa. En el día 0, se midió la glucosa en sangre para asignar los ratones a 4 grupos diferentes, con 8-10 ratones en cada grupo, con una media de glucosa en sangre que no difiere significativamente entre sí. En el día 1, se midió la glucosa en sangre 2 horas después de la primera dosis. En el día 3, se midió la glucosa en sangre 2 horas después de la tercera dosis. En el día 4, se midió la glucosa en sangre 24 horas después de la tercera dosis. El día 5 se tomó una muestra de sangre, y por lo tanto la medición de la glucosa en sangre, fue 48 horas después de la última (tercera) dosis.

Los resultados se muestran en la Tabla 3 más abajo, en la que la glucosa en sangre se indica en mM (media $\pm$ S.E.M (n=8 o 10).

Tabla 3: Efecto sobre la Glucosa en Sangre en ratones db/db

Tratamiento / Dosificación	Día 0	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5
Vehículo	21,7 $\pm$ 1,4	23,6 $\pm$ 1,2	22,8 $\pm$ 1,1	22,3 $\pm$ 2,1	23,9 $\pm$ 1,6
Met-FGF21 / 0,24 mg/kg	21,6 $\pm$ 1,0	24,0 $\pm$ 0,8	20,5 $\pm$ 1,2	20,6 $\pm$ 1,8	22,5 $\pm$ 1,9
Derivado del Ejemplo 4 / 0,22 mg/kg (Compuesto F)	22,8 $\pm$ 1,5	21,0 $\pm$ 1,4	18,5 $\pm$ 1,4	14,7 $\pm$ 1,3	17,1 $\pm$ 1,5
Derivado del Ejemplo 4 / 0,70 mg/kg (Compuesto F)	21,5 $\pm$ 1,7	17,3 $\pm$ 2,2	13,8 $\pm$ 1,8	11,6 $\pm$ 1,5	13,6 $\pm$ 1,5
Derivado del Ejemplo 6 / 1,01 mg/kg (Compuesto O)	20,6 $\pm$ 2,0	16,8 $\pm$ 2,0	15,7 $\pm$ 2,1	12,4 $\pm$ 2,2	12,9 $\pm$ 1,5

Los resultados demuestran que los derivados del FGF21 de la invención son biológicamente activos in vivo, a saber ellos disminuyen efectivamente la glucosa en sangre en comparación con el vehículo. Los derivados de la invención incluso parecen ser más efectivos que el FGF21 de tipo silvestre con respecto a su capacidad de disminuir la glucosa en sangre así como también a la duración de la acción.

Ejemplo 11: Evaluación in vivo de los compuestos del FGF21 – farmacocinética

ratones db/db

El perfil farmacocinético de los compuestos del FGF21 de la invención (Compuestos F, H, y O, preparados como se describió en los Ejemplos 4, 5 y 6, respectivamente) se evaluó en ratones machos db/db. Met-FGF21 (Compuesto A) se incluyó para la comparación en tres niveles de dosis, a saber. 0,125, 0,5 y 1 mg/kg subcutáneamente.

Los compuestos de la invención se evaluaron a un nivel de dosis, a saber. 0,5 mg/kg subcutáneamente (aproximadamente 24 nm/kg). Los niveles plasmáticos del compuesto comparativo se siguieron durante 6 horas, mientras que los niveles plasmáticos de los compuestos de la invención se siguieron durante 48 horas.

El $T_{1/2}$ en plasma se estimó que era 1,3-1,7 horas para el compuesto comparativo (1,4 horas cuando se dosificó a 0,5 mg/kg, como los compuestos en evaluación), 8,2 horas para el Compuesto F, 15,9 horas para el Compuesto H, y 14,6 horas para el Compuesto O.

Mini cerdos

El perfil farmacocinético del Met-FGF21 (Compuesto A), y de un compuesto del FGF21 de la invención (Compuesto F, preparado como se describió en el Ejemplo 4) se evaluaron en mini cerdos Göttingen machos normales, n=3-4, (12-15 meses de edad, 25 kg). La concentración plasmática del Compuesto A se controló durante una semana, mientras que la concentración plasmática del Compuesto F se controló durante dos semanas. Ambos compuestos se administraron como una dosis intravenosa única de 0,1 mg/kg (aproximadamente 5 nmol/kg).

La vida media ($T_{1/2}$) promedio del compuesto comparativo (Compuesto A) fue de 10,4 horas con una desviación estándar de 3,1 horas, mientras que la $T_{1/2}$ promedio del compuesto de la invención (Compuesto F) fue de 91,9 horas, con una desviación estándar de 17,1 horas.

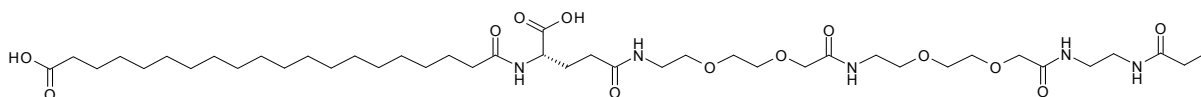
Los niveles plasmáticos de los compuestos del FGF21 se determinaron mediante el uso del ELISA específico para el Factor de Crecimiento de Fibroblastos-21 Humano (comercializado por BioVendor, núm. de catálogo RD191108200R).

Estos resultados confirman fuertemente el efecto prolongado de los derivados del FGF21 de la invención.

Ejemplo 12: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado S71C del Met-FGF21, S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoil-amino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoil)-metil) [Cys71] Met-FGF21 (Compuesto O)

El residuo de Cys en la posición 71 en el análogo S71C Met-FGF21, preparado como se describe generalmente en los Ejemplos 2 y 3 (sec. con núm. de ident.:1 con S71C y una M en el N-terminal), se modificó en el grupo tiol con el siguiente reactivo:



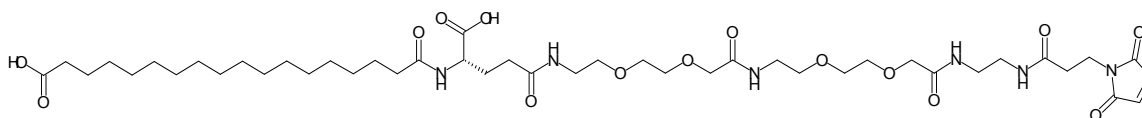
Procedimiento general B

- 5 [Cys71] Met-FGF21 (21,8 mg, 1,1 μ mol), liofilizado a partir de NH_4HCO_3 , se disolvió en TRIS 20 mM, NaCl 0,5, pH 8,0 (4,36 mL). El ácido 19-[(S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil]-metoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-propilcarbamoil]-nonadecanoico (5,4 mg, 5eq), que se preparó como se describió anteriormente, se disolvió en TRIS 0,02 M, NaCl 0,5 M pH 8,0 tampón/acetonitrilo 1:1 (1,09 mL) y se
- 10 adicionó a la solución de [Cys71] Met-FGF21. Después de 2 horas y 15 minutos la mezcla se desalinizó en HiPrep 26/10 en tampón A (1,5 CV). Las fracciones agrupadas se purificaron mediante intercambio aniónico en una columna monoQ 5/50 GL mediante el uso del tampón A: TRIS 20 mM, pH 7,8; tampón B: TRIS 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,8, flujo 0,5 mL y un gradiente de 0-100 % B sobre 60CV. Las fracciones aisladas que contenían el producto se agruparon y se realizó un cambio para el tampón NH_4HCO_3 50 mM mediante el uso de columnas PD 10 (GE 179851-01). El eluato se recolectó y filtró a través de un filtro estéril Millex GV de 0,22 μ m y se liofilizó. Rendimiento
- 15 6.7 mg.

LCMS1: Masa teórica: 20 400,2 Encontrado: 20 402,3

Ejemplo 13: Preparación de otro derivado Cys de un análogo del FGF21

- 20 Preparación del derivado S71C Met-FGF21, S-71-[1-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil]-etil-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys71] Met-FGF21
- 25 El residuo Cys en la posición 71 en el análogo S71C Met-FGF21, preparado como se describió generalmente en los Ejemplos 2 y 3 (sec. con núm. de ident.:1 con S71C y una M en el N-terminal), se modificó en el grupo tiol la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



- 30 El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento general A del Ejemplo 5, sin la purificación por exclusión de tamaño. Rendimiento 2,88 mg.

LCMS1: Masa teórica: 20 483,3. Encontrado: 20 483.

- 35 Ejemplo 14: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado S71C Met-FGF21, S-71-[(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoil-amino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil] [Cys71] Met-FGF21

- 40 Preparación del ácido 17-[(S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil]-metoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-propilcarbamoil]-heptadecanoico

Etapa 1: Ácido 17-[(S)-3-(2-[2-(2-[2-(2-Amino-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-1-carboxi-propilcarbamoil]-heptadecanoico

- 45 A una solución de etanol (10 mL) y etilendiamina (1 mL) se adicionó el ácido 17-[(S)-1-carboxi-3-[2-[2-[(2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-propilcarbamoil]-heptadecanoico (500 mg). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla se concentró al vacío a 40 °C. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (acetonitrilo 10-65 %, TFA 0,1 %, 20 mL/minuto, C18, 30 mmx250 mm, 110 Å). Rendimiento 332 mg (70 %).
- 50

LCMS3: Masa teórica: 776,0. Encontrado: 776,6 (M+1).

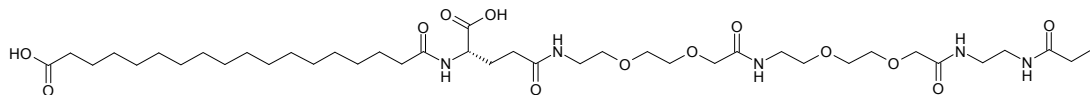
Etapa 2: Ácido 17-[(S)-1-Carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil]-metoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-propilcarbamoil]-heptadecanoico

- 55 A una solución de ácido yodoacético (92 mg) en acetonitrilo (1 mL) se adicionó TSTU (142 mg) y DIPEA (0.085 mL). Después de agitar durante 60 minutos a RT, una solución de ácido 17-[(S)-3-(2-[2-(2-[2-(2-Amino-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-1-carboxi-propilcarbamoil]-heptadecanoico (0,320 g) en

Na₂CO₃ 0,1 M (12 mL). Después de agitar durante 120 minutos, el pH de la mezcla se ajustó a 1 con HCl 1 N. El precipitado se filtró completamente, se lavó con agua y se secó al vacío. Rendimiento 350 mg (90 %).

LCMS3: Masa teórica: 943,9 Encontrado: 944,6 (M+1).

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo S71C Met-FGF21, preparado como se describió generalmente en los Ejemplos 2 y 3 (sec. con núm. de ident.:1 con S71C y una M en el N-terminal), se modificó en el grupo tiol la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



Procedimiento general B (NaCl)

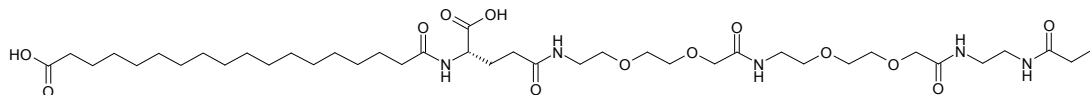
El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento general B del Ejemplo 12, a pH 7,5 y sin la purificación por exclusión de tamaño. Rendimiento 15,9 mg (38 %).

LCMS1: Masa teórica: 20 372,19 Encontrado: 20 372,34.

Ejemplo 15: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1G, 71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{[(S)-4-carboxi-4 (17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil} [71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Gly-FGF21

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo del FGF21 (-1G, 71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.:1), se modificó en el grupo tiol en la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



Procedimiento general B (NaCl)

El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento general B del Ejemplo 12. La reacción se realizó en una mezcla 1:1 de TRIS 20 mM, NaCl 0,5, pH 7,5 y tampón DPBS. Se excluyó la purificación por exclusión de tamaño. Rendimiento 19,5 mg (58 %).

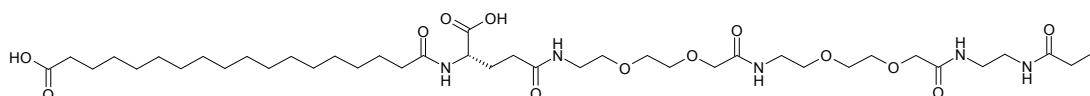
LCMS1: Masa teórica: 20 511 Encontrado: 20 511.

Ejemplo 16: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1G, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil} [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Gly-FGF21

Procedimiento general C:

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo del FGF21 (-1G, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.: 1), se modificó en el grupo tiol en la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



Al FGF21 (-1G, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) (33,8 mg, 1,7 umol) en tampón DPBS (2,7 mg/mL) se adicionó TRIS (3 mg) y cloruro de sodio (29 mg). El ácido 17-((S)-1-Carboxi-3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil]-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil]-metoxi)-etoxi]-etilcarbamoil]-propil-

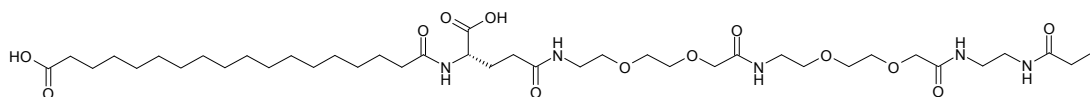
carbamoyl]-heptadecanoico (8 mg, 5eq), que se preparó como se describió anteriormente, se disolvió en tampón TRIS 0,02 M, NaCl 0,5 M pH 7,5 (0,2 mL) y acetonitrilo (0,3 mL) y se adicionó a la solución del FGF21 (-1G, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K). Después de 5 horas la mezcla se filtró a través de un filtro Millex GV estéril de 0,22 µm y se desalinizó en dos HiPrep 26/10 en una fila, en tampón A (1,5 CV). Las fracciones agrupadas se purificaron mediante intercambio aniónico en una columna Source 15Q 4,6/100 PE mediante el uso del tampón A: TRIS 20 mM, pH 7,5; tampón B: TRIS 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5, flujo 2,5 mL y un gradiente de 5-40 % B sobre 40CV. Las fracciones aisladas que contenían el producto se agruparon y el tampón se cambió para tampón DBPS en una columna HiPrep 26/10. El eluato se concentró mediante el uso de filtros de centrifuga Vivaspin 20 (10000 MWCO), se recolectó y se filtró a través de un Millex GV estéril de 0,22 µm. Rendimiento 10,9 mg (31 %).

LCMS1: Masa teórica: 20 525. Encontrado: 20 525.

Ejemplo 17: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoyl]-metil) [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ala-FGF21

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.:1), se modificó en el grupo tiol en la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



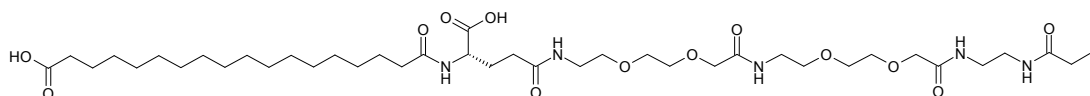
El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento general C del Ejemplo 16. Rendimiento 11,4 mg (33 %).

LCMS1: Masa teórica: 20 539,4. Encontrado: 20 539,5.

Ejemplo 18: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1S, 71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoyl]-metil) [71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ser-FGF21

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo del FGF21 (-1S, 71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.:1), se modificó en el grupo tiol en la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento general C del Ejemplo 16, mediante el uso de una columna MonoQ 5/50 GI para la purificación. Rendimiento 20,9 mg (58 %).

LCMS1: Masa teórica: 20 541, Encontrado: 20 541.

Ejemplo 19: Preparación de un derivado adicional en el N-terminal de un análogo del FGF21

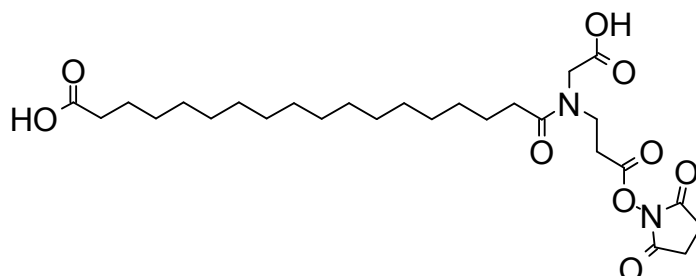
Preparación del derivado del FGF21 (-5G, -4S, -3G, -2S, -1G, 56R, 59R, 69R, 102E, 121Q, 122R, 168L) N-alfa-3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionil (-5G, -4S, -3G, -2S, -1G, 56R, 59R, 69R, 102E, 121Q, 122R, 168L) FGF21

Preparación del ácido 17-{carboximetil-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxycarbonil)-etil]-carbamoyl}-heptadecanoico

El ácido 17-{tert-Butoxicarbonilmetil-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxycarbonil)-etil]-carbamoyl}-heptadecanoico tert-butil éster (240 mg), preparado como se describió en el documento WO2005/012347, se trató con TFA 95 % durante 1 hora y se concentró al vacío. El residuo se concentró conjuntamente con acetonitrilo para proporcionar un sólido blanco en un rendimiento cuantitativo, 200 mg.

LCMS3: Masa teórica: 540,7, Encontrado: 541,3 (M+1).

La posición del N-terminal en el análogo del FGF21 (-5G, -4S, -3G, -2S, -1G, 56R, 59R, 69R, 102E, 121Q, 122R, 168L), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.:1), se modificó con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento del Ejemplo 7, mediante el uso de una columna MonoQ 5/50 GI para la purificación.

LCMS3: Masa teórica: 20 301,9, Encontrado: 1 451,2 (M+14).

Los derivados del FGF21 de la invención en los siguientes ejemplos pueden prepararse de manera similar:

Ejemplo 20: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1G, 71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-etilcarbamoil}-metil) [71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Gly-FGF21

Ejemplo 21: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1G, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-etilcarbamoil}-metil) [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Gly-FGF21

Ejemplo 22: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-etilcarbamoil}-metil) [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ala-FGF21

Ejemplo 23: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1S, 71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-etilcarbamoil}-metil) [71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ser-FGF21

Ejemplo 24: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1G, 71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-etilcarbamoil}-metil) [71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Gly-FGF21

Ejemplo 25: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1G, 71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-

etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil)-metil) [71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Gly-FGF21

Ejemplo 26: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

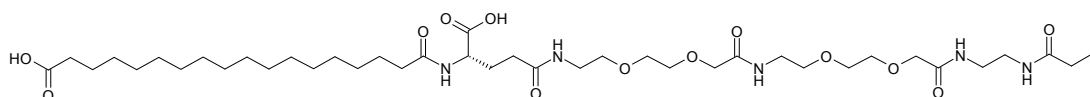
Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil)-metil) [71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ala-FGF21

Se prepararon los siguientes ejemplos

Ejemplo 27: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil)-metil) [71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ala-FGF21

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo del FGF21 (-1A, 71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.:1), se modificó en el grupo tiol en la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento general C del Ejemplo 16, mediante el uso de una columna MonoQ 5/50 GI para la purificación, con la excepción de los tampones, a los que se les adicionó etanol 5 %. Rendimiento 18,2 mg (43 %).

LCMS1: Masa teórica: 20 553,39, Encontrado: 20 552,88.

En los siguientes ejemplos, los derivados del FGF21 de la invención pueden prepararse de manera similar:

Ejemplo 28: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

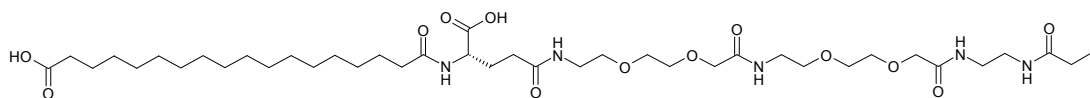
Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K, 182G) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil)-metil) [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K, 182G] Gly-FGF21

Se prepararon los siguientes ejemplos

Ejemplo 29: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil)-metil) [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E] Ala-FGF21

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.:1), se modificó en el grupo tiol en la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



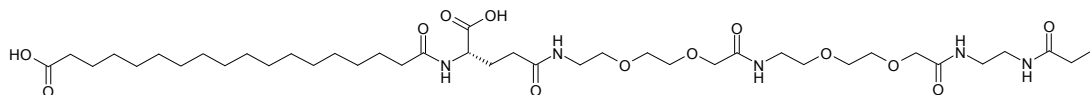
El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento general C del Ejemplo 16, mediante el uso de una columna MonoQ 4,6/100 PE para la purificación, con la excepción de los tampones, a los que se les adicionó etanol 5 %. Rendimiento 19,8 mg (46 %).

LCMS1: Masa teórica: 20 498,40 Encontrado: 20 498,07

Ejemplo 30: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-((S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil) [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181K] Ala-FGF21

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.:1), se modificó en el grupo tiol en la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento general C del Ejemplo 16, mediante el uso de una columna MonoQ 4,6/100 PE para la purificación, con la excepción de los tampones, a los que se les adicionó etanol 5 %. Rendimiento 11,3 mg (40 %).

LCMS1: Masa teórica: 20 411,32, Encontrado: 20 410,90

En los siguientes ejemplos, los derivados del FGF21 de la invención pueden prepararse de manera similar:

Ejemplo 31: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 143V, 145E, 146E, 148aD, 149L, 150R, 152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, 154F, 155S, 156S, 158L, 159E, 160T, 161D, 163M, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-((S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil) [71C, N121Q, 143V, 145E, 146E, 148aD, 149L, 150R, 152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, 154F, 155S, 156S, 158L, 159E, 160T, 161D, 163M, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E] Ala-FGF21

Ejemplo 32: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 28R, 56R, 59R, 69R, S71C, 102T, 121Q, 122R, 166F, 167G, 168L, 170T) S-71-({2-[2-(2-[2-(2-[2-((S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etilcarbamoil]-metil) [28R, 56R, 59R, 69R, S71C, 102T, 121Q, 122R, 166F, 167G, 168L, 170T] Ala-FGF21

Ejemplo 33: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1G, 71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-([2-[3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino]-etilcarbamoil]-metil) [71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Gly-FGF21

Preparación del ácido 17-(carboximetil-{2-[2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil]-etil}-carbamoil)-heptadecanoico

Etapas 1: Ácido 17-([2-(2-Amino-etilcarbamoil)-etil]-carboximetil-carbamoil)-heptadecanoico

A una solución de etilendiamina (0,3 mL) en THF (4 mL) se adicionó una solución de ácido 17-{carboximetil-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxycarbonil)-etil]-carbamoil}-heptadecanoico (190 mg), preparada como se describe en el Ejemplo 19. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y se purificó directamente por HPLC preparativa mediante el uso de TFA 0,1 % en agua y TFA 0,1 % en acetonitrilo como eluyentes. Las fracciones que contenían los productos se agruparon y se liofilizaron. Rendimiento 60 mg (35 %).

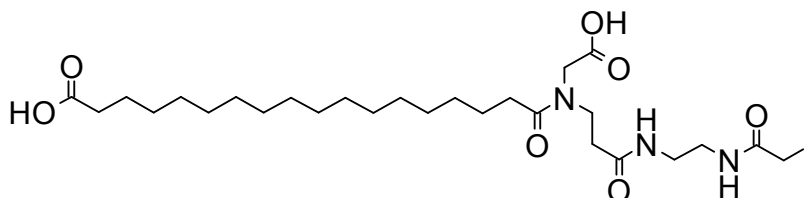
LCMS3: Masa teórica: 485,67 Encontrado: 486,38 (M+1).

Etapas 2: Ácido 17-(Carboximetil-{2-[2-(2-yodo-acetilamino)-etilcarbamoil]-etil}-carbamoil)-heptadecanoico

A una solución de yodoacetamida (35 mg) en acetonitrilo (0,50 mL) se adicionó TSTU (56 mg) y DIPEA (0,032 mL). La mezcla se agitó durante 1 hora antes de adicionar una solución de ácido 17-{[2-(2-amino-etilcarbamoil)-etil]-carboximetil-carbamoil}-heptadecanoico (60 mg) en Na₂CO₃ 0,1 M (5 mL). La mezcla se agitó durante 2 horas y se acidificó a pH 1 con HCl 1N. La mezcla se centrifugó. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con agua y se secó al vacío. Rendimiento 75 mg (93 %)

LCMS3: Masa teórica: 653,60 Encontrado: 654,27 (M+1).

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo del FGF21 (-1G, 71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 puede modificarse en el grupo tiol en la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente mediante el uso del procedimiento general A, B, o C.



Ejemplo 34: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

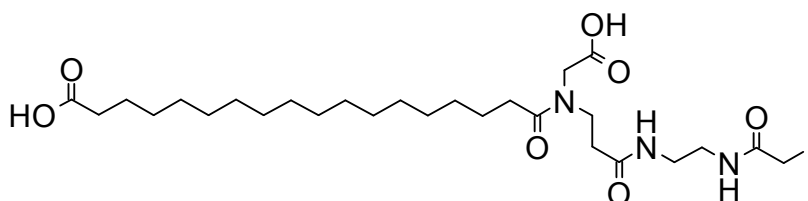
Preparación del derivado del FGF21 (-1G, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoyl)-metil] [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Gly-FGF21

Se prepararon los siguientes ejemplos

Ejemplo 35: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoyl)-metil] [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ala-FGF21

El residuo Cys en la posición 71 en el análogo del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.:1), se modificó en el grupo tiol en la posición 71 con el reactivo preparado como se describió anteriormente:



El compuesto se preparó mediante el uso del procedimiento del Ejemplo 16. Rendimiento 9,3 mg (33 %).

LCMS1: Masa teórica: 20 249,05 Encontrado: 20 249,58.

Los derivados del FGF21 de la invención en los siguientes ejemplos pueden prepararse de manera similar

Ejemplo 36: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1S, 71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoyl)-metil] [71C, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ser-FGF21

Ejemplo 37: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1G, 71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-[(2-{3-[(17-Carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoyl)-metil] [71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Gly-FGF21

Ejemplo 38: Derivatización adicional de los compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

Preparación del derivado del Ala-FGF21 (Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) N-alfa-1-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-

acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] [Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T] Ala-FGF21

5 El residuo Met en el N-terminal en el análogo Ala-FGF21 (Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T), preparado como se describió generalmente en el Ejemplo 56 (sec. con núm. de ident.:1 con Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) FGF21 y una Ala en el N-terminal), pudieran modificarse en el grupo alfa amino como se describió en el Ejemplo 7.

10 Ejemplo 39: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoil)-metil] [71C, 102E, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ala-FGF21

15 Ejemplo 40: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K) S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoil)-metil] [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K] Ala-FGF21

20 Ejemplo 41: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

Preparación del derivado del FGF21 -1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K, 182G S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoil)-metil] [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181K, 182G] Ala-FGF21

Ejemplo 42: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

30 Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E) S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoil)-metil] [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E], Ala-FGF21

Ejemplo 43: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

35 Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181K) S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoil)-metil] [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des 181K] Ala-FGF21

Ejemplo 44: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

40 Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 71C, 121Q, 143V, 145E, 146E, 148aD, 149L, 150R, 152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, 154F, 155S, 156S, 158L, 159E, 160T, 161D, 163M, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E) S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoil)-metil] [71C, 121Q, 143V, 145E, 146E, 148aD, 149L, 150R, 152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, 154F, 155S, 156S, 158L, 159E, 160T, 161D, 163M, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E] Ala-FGF21

Ejemplo 45: Preparación de un derivado Cys adicional de un análogo del FGF21

50 Preparación del derivado del FGF21 (-1A, 28R, 56R, 59R, 69R, S71C, 102T, 121Q, 122R, 166F, 167G, 168L, 170T) S-71-[(2-{3-[(17-carboxi-heptadecanoil)-carboximetil-amino]-propionilamino}-etilcarbamoil)-metil] [28R, 56R, 59R, 69R, S71C, 102T, 121Q, 122R, 166F, 167G, 168L, 170T] Ala-FGF21

Ejemplo 46: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

55 Preparación del derivado del Gly-FGF21 (K56R, K59R, K69R, K122R) N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] [K56R, K59R, K69R, K122R] Gly-FGF21

El derivado del FGF-21 se preparó y se purificó de manera similar a como se describió en el Ejemplo 7.

60 LCMS1: Masa teórica: 20 293,9 Encontrado: 20 294,2

Ejemplo 47: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

Preparación del derivado del Gly-FGF21 (28R, K56R, 59R, 69R, 102T, 121Q, 122R, 168L, 179F, 180E, 181R) N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] [28R, K56R, 59R, 69R, 102T, 121Q, 122R, 168L, 179F, 180E, 181R] Gly-FGF21

- 5 El derivado del FGF-21 se preparó y se purificó de manera similar a como se describió en el Ejemplo 7.
LCMS1: Masa teórica: 20 415,1 Encontrado: 20 415,3

Ejemplo 48: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

- 10 Preparación del derivado del Gly-FGF21 (K56R, 59R, 69R, 122R, 168L) N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] [K56R, 59R, 69R, 122R, 168L] Gly-FGF21

El derivado del FGF-21 se preparó y se purificó de manera similar a como se describió en el Ejemplo 7.

- 15 LCMS1: Masa teórica: 20 275,9 Encontrado: 20 276,1

Ejemplo 49: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

- 20 Preparación del derivado del Gly-FGF21 (K56R, 59R, 69R, 122R, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181R) N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] [K56R, 59R, 69R, 122R, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181R] Gly-FGF21

- 25 El derivado del FGF-21 se preparó y se purificó de manera similar a como se describió en el Ejemplo 7.

LCMS1: Masa teórica: 20 535,2 Encontrado: 20 535,6

Ejemplo 50: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

- 30 Preparación del derivado del Ser-FGF21 (K56R, 59R, 69R, 122R, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181R) N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] [K56R, 59R, 69R, 122R, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, 181R] Gly-FGF21

- 35 El derivado del FGF-21 se preparó y se purificó de manera similar a como se describió en el Ejemplo 7.
LCMS1: Masa teórica: 20 565,2 Encontrado: 20 565,5

- 40 Ejemplo 51: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

Preparación del derivado del FGF21 (-14E, -13E, -12A, -11E, -10A, -9G, -8G, -7A, -6G, -5G, -4S, -3G, -2G, -1S, K56R, 59R, 69R, 122R) N-alfa-1-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butiril] [-14E, -13E, -12A, -11E, -10A, -9G, -8G, -7A, -6G, -5G, -4S, -3G, -2G, -1S, K56R, 59R, 69R, 122R] FGF21

- 45 El derivado del FGF-21 se preparó y se purificó de manera similar a como se describió en el Ejemplo 7.
LCMS1: Masa teórica: 21 063,6 Encontrado: 21 063,8

- 50 Ejemplo 52: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

Preparación del derivado del FGF21 (-5G, -4S, -3G, -2S, -1G, K56R, 59R, 69R, 102E, 121Q, 122R, 168L) N-alfa-1-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] [-5G, -4S, -3G, -2S, -1G, K56R, 59R, 69R, 102E, 121Q, 122R, 168L] FGF21

- 55 El derivado del FGF-21 se preparó y se purificó de manera similar a como se describió en el Ejemplo 7.
LCMS1: Masa teórica: 20 592,2 Encontrado: 20 592,9

- 60 Ejemplo 53: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

Preparación del derivado del Gly-FGF21 (K56R, K59R, K69R, K122R) N-alfa-1-(2-[2-(2-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilamino)-etoxi)-etoxi)-acetil] [K56R, K59R, K69R, K122R] Gly-FGF21

A 10 mg (511 nmol) del (K56R, K59R, K69R, K122R) Gly-FGF21 en 1,72 mL de tampón se le cambió el tampón con una columna 4 NAP-5 para tampón DPBS. La concentración de proteínas se determinó que era 2,5mg/mL. A la solución se adicionaron 400 µl de HPβCD 20 % (Hidroxipropil Beta Ciclodextrina) y 400 µl de N-acetil-L-Metionina 10 %, pH 7,5. A esta solución se adicionaron 8 eq (0,004086 mmol) de succinimidil éster activo de ácido {2-[2-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilamino)-etoxi]-etoxi}-acético en 200 µl de NMP a 7 °C. El succinimidil éster se generó con N,N-disuccinimidil carbonato (CAS 74124-79-1) 1:1 durante 20 minutos. Después de 90 minutos, se adicionaron 4 mL de NaOH 0,2 M frío y la reacción se mantuvo a 4 °C durante 30 minutos. Después se adicionaron 4 mL de HCl 0,2 M y se ajustó el pH a 7,3.

La mezcla de la reacción se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico y se liofilizó como se describió en el Ejemplo 4.

LCMS1: Masa teórica: 20 029,66 Encontrado: 20 029,82.

Ejemplo 54: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

Preparación del derivado del Gly-FGF21 (K56R, K59R, K69R, K122R) N-alfa1-[4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)-butiril] [K56R, K59R, K69R, K122R] Gly-FGF21

El succinimidil éster de ácido 4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)-butírico se generó mediante la disolución de 139 mg de ácido 4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)-butírico y 115 mg de N-hidroxi succinimida en 1 mL de DMF (calentado en agua caliente durante unos pocos segundos). Se adicionaron 145 mg de hidrocloreto de (3-dimetilaminopropil) etil carbodiimida y la mezcla se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de 3,5 horas la mezcla se vertió en 8mL de agua y se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante, y la suspensión y la centrifugación se repitieron 2 veces.

A 10 mg de (K56R, K59R, K69R, K122R) Gly-FGF21 en 1,72 mL DPBS se le cambió el tampón para DPBS, 4 mL después de la elución. Se adicionaron 400 µl de N-acetilmetionina 10 % (el pH se ajustó aproximadamente a 8) y 400 µl de ciclodextrina 20 %. Se adicionaron 200 µl de una solución de ácido 4-(16-(tetrazo-5-il)-hexadecanoilsulfamoil) butírico succinimidil éster 330 µg, en 1 400 µl de NMP. La mezcla de la reacción se mantuvo a 7 °C durante la noche. A la mezcla de la reacción se adicionaron 4 mL de NaOH 0,2 M a 4 °C. Después de 30 minutos la mezcla se neutralizó con 3,9 mL de HCl 0,2 M.

La mezcla de la reacción se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, y se liofilizó como se describió en el Ejemplo 4.

LCMS1: Masa teórica: 20 033,67 Encontrado: 20 033,72.

Ejemplo 55: Derivatización de compuestos del FGF21 en el N-terminal con aglutinantes de albúmina

Preparación del derivado del FGF21 (-5G, -4S, -3G, -2S, -1G, K56R, 59R, 69R, 102E, 121Q, 122R, 168L) N-alfa-1-[4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)-butiril] [-5G, -4S, -3G, -2S, -1G, K56R, 59R, 69R, 102E, 121Q, 122R,168L] FGF21

El derivado del FGF-21 se preparó y se purificó de manera similar a como se describió en el Ejemplo 54.

LCMS1: Masa teórica: 20 331,94 Encontrado: 20 332,39

Ejemplo 56: Clonación y expresión de los análogos del FGF21

Los siguientes compuestos se prepararon y se purificaron como se describió en los ejemplos 2 y 3:

- 5 56a) (K56R, K59R, K69R, K122R) Gly-FGF21;
56b) (K56R, K59R, K69R, K122R, M168L) Gly-FGF21;
56c) (Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, M168L, Y179F, A180E, S181R) Gly-FGF21 ;
56d) (K56R, K59R, K69R, D102E, N121Q, K122R, M168L) GSGSG-FGF21;
56e) (S71C, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) Gly-FGF21;
56f) (K56R, K59R, K69R, K122R, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181R) Ser-FGF21;
10 56g) (K56R, K59R, K69R, K122R, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181R) Gly-FGF21;
56h) (K56R, K59R, K69R, K122R) EEAEAGGAGGSGGS-FGF21;
56i) (S71C, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) Ser-FGF21;
56j) (S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) Gly-FGF21;
15 56k) (S71C, D102E, N121Q, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) Gly-FGF21;
56l) (S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) Ala-FGF21;
20 56m) (S71C, D102E, N121Q, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) Ala-FGF21;
56n) (Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ala-FGF21 ;
56o) (S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E) Ala-FGF21;
25 56p) (S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181G) Ala-FGF21;
56q) (S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des S181) Ala-FGF21;
56r) (D102N) Met-FGF21;
56s) (Q15F) Met-FGF21;
30 56t) (D24K) Met-FGF21;
56u) (V16K) Met-FGF21;
56v) (S71C, M168I) Gly-FGF21;
56x) (S71C, M168L) Gly-FGF21;
56y) (K56R, K59R, K69R, K122R) FGF21;
35 56z) (N121Q) Met-FGF21;
56aa) (des N121) Met-FGF21;
56ab) (S71C) Gly-FGF21;
56ac) (P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) Met-FGF21;
40 56ad) (145aP, 145bM, L146V, P149E, G151E, I152D, A154R, P155G, Q156H, P157L, P158E, D159S, V160D, G161M, S162F, D164S, S167E, M168T, V169D, G170S, P171M, S172D, Q173P, G174F, R175G, S176L, P177V, S178T, Y179G, A180L, S181E, 182A, 183V, 184R, 185S, 186P, 187S, 188F, 189E, 190K) Met-FGF21;
56ae) (Q27E, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, Y179F, A180E, S181R) Gly-FGF21;
45 56af) (Q15F, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, Y179F, A180E, S181R) Gly-FGF21;
56ag) (S71C, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) Gly-FGF21;
56ah) (L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181K) Ser-FGF21;
50 56ai) (M168A) Met-FGF21;
56aj) (M168S) Met-FGF21;
56ak) (K56R, K59R, K69R, K122R, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181R) FGF21;
56al) (M168S) Ser-FGF21;
55 56am) (Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, D159E, M168L, G174A, Y179F) Gly-FGF21 ;
56an) (K56R, K59R, K69R, K122R) EESAASGAAAGSAAA-FGF21;
56ao) (Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Gly-FGF21 ;
56ap) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, S181R) FGF21;
60 56aq) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, desS181) FGF21;
56ar) (N121D) Met-FGF21; y
56as) (A26E, K56R, K59R, K69R, D102T, N121Q, K122R, Y179F, A180E, S181R) Gly-FGF21.

Ejemplo 57: Clonación y expresión de los análogos del FGF21

Los siguientes derivados del FGF21 pueden prepararse de manera similar a como se describió en los ejemplos 2 y 3:

57a) (Q28R, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ala-FGF21;
 57b) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R) Gly-FGF21;
 57c) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R) Ala-FGF21;
 57d) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R) Ser-FGF21;
 57e) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R) FGF21;
 57f) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Gly-FGF21;
 57g) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ala-FGF21;
 57h) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ser-FGF21;
 57i) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) FGF21;
 57j) P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21;
 57k) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21; 57l) (S71C, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21;
 57m) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21;
 57n) (K56R, K59R, K69R, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21;
 57o) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21;
 57p) (S71C, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21;
 57q) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21;
 57r) (K56R, K59R, K69R, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21;
 57s) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) FGF21; 57t) (S71C, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) FGF21;
 57u) (K56R, K59R, K69R, N121Q, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) FGF21;
 57v) (K56R, K59R, K69R, K122R, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) FGF21;

Ejemplo 58: Ensayo de fosforilación Erk HEK293/beta-klotho

El ensayo de fosforilación Erk se realizó en células HEK293 que se transfectaron de manera estable con el beta-Klotho humano. Las células HEK293T/b-klotho estables se sembraron a 30,000 células/pocillo en una placa de 96

5 pocillos. Después de dos días, se adicionó medio fresco, y después de 2 horas adicionales se adicionaron las proteínas FGF21. Las placas se incubaron durante 12 minutos. Y la fosforilación total de ERK se evaluó mediante el uso de un Kit de ensayo AlphaScreen SureFire Phospho-ERK1/2 (Perkin Elmer, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y un lector de microplacas EnVision Multilabel modelo 2103 (Perkin Elmer) con el uso de la opción del AlphaScreen HTS Turbo para la detección de la señal. Los datos se presentan como las medias $\pm$ S.E.M. Los valores de EC50 se determinaron a partir de un análisis de regresión logística no lineal de 4 parámetros mediante el uso del programa GraphPad Prism versión 5.02. Referencias: Yie, J. y otros: FGF21 N- y C-termini play different roles in receptor interaction y activation, *FEBS Letters* 583 (2009) 19–24, y Micanovic R. y otros.: Different roles of N- and C- termini in the functional activity of FGF21. *J. Cell. Physiol.* 2009 May; 219(2):227-34.

10 Tabla 4: ERK

Compuesto del ejemplo número	Compuesto	Valores de la Mediana de pERK-HEK293-Beta-klotho sin HSA [EC50 (nM)]
1	A	1,6
56h		2,0
51		12
56n		
56m		3,3
56l	I	2,0
17		3
2i		2,1
56af		75,0
2p		1,8
56as	J	44,0
56ae		36,0
56am		15,0
56ao		1,0
56c		29,0
47	V	10,0
756a		7,4
46		3,9
53		6,4
54		4,2
56g		3,3
49		1,2
48		4,6
56ab		2,5
56k		1,8
56j		1,1
16		1,4
56ag		1,4
15		1,6
56r		,7
2h	M	1,7
56ar		1,2
56z		1,0
2a		n.t.
4		,9
56ac	B	9,5
56ad		17,0
56s		3,3
2o		1,0
56ai		100,0
2l	K	1,4
56aj		100,0
2n		3,9
2m		5,9
56t		6,7

Compuesto del ejemplo número	Compuesto	Valores de la Mediana de pERK-HEK293-Beta-klotho sin HSA [EC50 (nM)]
2i	N	4,7
2k	Q	2,2
2j	P	1,0
7	V	1,4
2		100,0
2e	E	3,0
5	H	1,1
6 & 12	O	1,5
13		4,8
14		2,9
56aa		1,0
56ah		1,0
56al		100,0
56f		3,8
50		2,0
56i		2,2
18		2,5
56d		6,6
55		2,0
52		11
56ap		3
56y		12,0

Listado de secuencias

	<110> Novo Nordisk A/S
5	<120> Derivados del FGF21 con aglutinante de albúmina A-B-C-D-E- y sus usos
	<130> 7905.204-WO
	<160> 2
10	<170> PatentIn versión 3.5
	<210> 1
	<211> 181
15	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<220>
	<221> mat_peptide
20	<222> (1)..(181)
	<220>
	<221> DISULFID
	<222> (75)..(93)
25	<400> 1
30	
35	

ES 2 692 495 T3

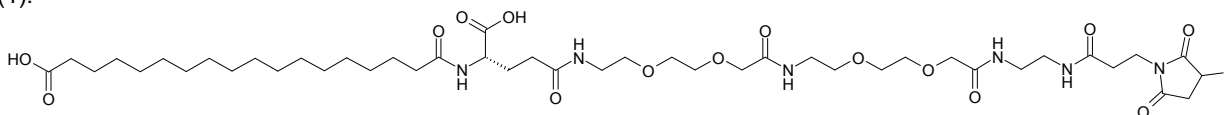
5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

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> 2
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(28)
 Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala
 20 25

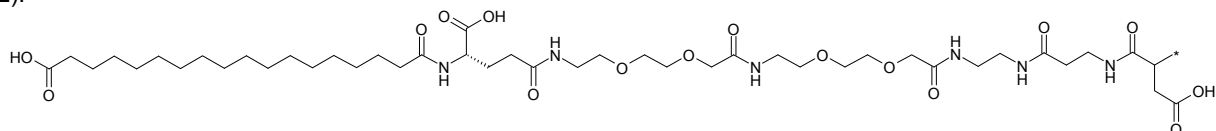
REIVINDICACIONES

1. Un derivado de un FGF21 que tiene un aglutinante de albúmina de la fórmula A-B-C-D-E- unido covalentemente, en donde A-B-C-D-E- se selecciona a partir de las siguientes fórmulas (1)-(8):

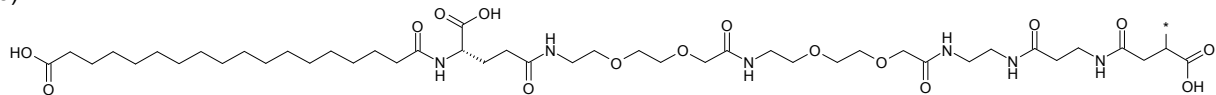
(1):



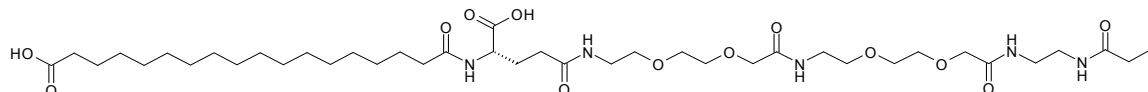
(2):



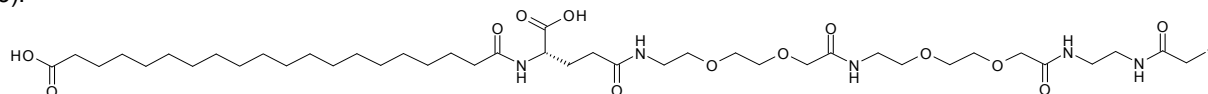
(3):



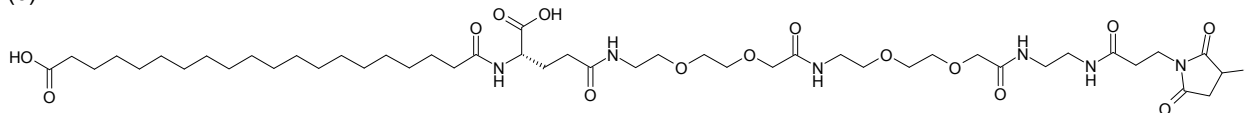
(4):



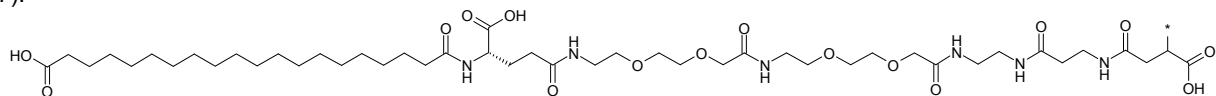
(5):



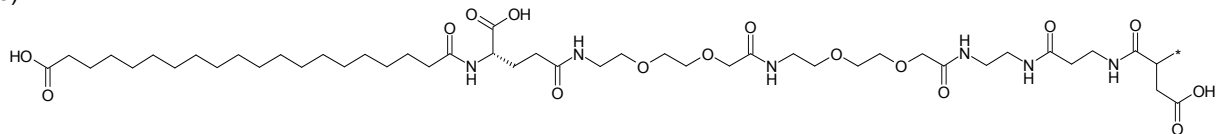
(6):



(7):



(8):



o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los derivados correspondientes.

2. El derivado de conformidad con la reivindicación 1, en donde la unión del aglutinante de albúmina tiene lugar a través del grupo tiol de un residuo de cisteína.

3. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto del FGF21 tiene una identidad de al menos 80 %, con la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente, al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 %.

4. Un derivado de conformidad con la reivindicación 1 que es cualquiera de los derivados: S-122-[1-2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-etil]-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys122]-Met-FGF21 (Compuesto F); S-71-[1-2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-etil]-2,5-dioxo-pirrolidin-3-il] [Cys71]Met-FGF21 (Compuesto H); S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nonadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) [Cys71]Met-FGF21 (Compuesto O); S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) [71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 169aT, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181K] Ala-FGF21; S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) [28R, 56R, 59R, 69R, S71C, 102T, 121Q, 122R, 166F, 167G, 168L, 170T] Ala-FGF21; S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) (Q28R, K56R, K59R, K69R, S71C, D102T, N121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ala-FGF21; S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21; S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ala-FGF21; S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21; S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) (S71C, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) Ser-FGF21; S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etilcarbamoil}-metil) (S71C, 121Q, P143V, A145E, L146E, 148aD, P149L, P150R, I152H, 153aE, 153bS, 153cD, 153dM, A154F, P155S, Q156S, P158L, D159E, V160T, G161D, S163M, L166F, S167G, M168L, 169aT, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181) FGF21; o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos compuestos.
5. Una composición que comprende un derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y un portador farmacéuticamente aceptable.
6. Un derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una composición de conformidad con la reivindicación 5, para usar como un medicamento.
7. Un derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una composición de conformidad con la reivindicación 5, para usar como un medicamento en el tratamiento o la prevención de la diabetes, la dislipidemia, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, el síndrome metabólico, y/o la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD).