

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 072**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/605** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61K 38/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04752589 .4**  
96 Fecha de presentación: **10.06.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1641823**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **PROTEÍNAS DE FUSIÓN ANÁLOGAS DE GLP-1.**

30 Prioridad:  
**12.06.2003 US 477880 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.12.2011**

73 Titular/es:  
**ELI LILLY AND COMPANY  
LILLY CORPORATE CENTER  
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:  
**GLAESNER, Wolfgang;  
MILLICAN, Rohn, Lee., Jr. y  
VICK, Andrew, Mark**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 072 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

Proteínas de fusión análogas de GLP-1

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a análogos del péptido símil glucagón fusionado a proteínas que tienen el efecto de extender la semivida *in vivo* de los péptidos. Estas proteínas de fusión pueden utilizarse para tratar la diabetes así como una variedad de otras condiciones o trastornos.

10 Los análogos y derivados del péptido 1 símil glucagón (GLP-1) son prometedores en ensayos clínicos para el tratamiento de la diabetes tipo 2. GLP-1 induce numerosos efectos biológicos, como estimulación de la secreción de insulina, inhibición de la secreción de glucagón, inhibición del vaciamiento gástrico, inhibición de la motilidad gástrica o de la motilidad intestinal, e inducción de pérdida de peso. Una característica significativa de GLP-1 es su capacidad para estimular la secreción de insulina, sin el riesgo asociado de hipoglucemia que se observa cuando se utiliza la terapia con insulina o algunos tipos de terapias orales que actúan aumentando la expresión de insulina.

15 La utilidad de la terapia que implican péptidos GLP-1 se ha visto limitada por el hecho de que GLP-1(1-37) no es muy activo, y los dos péptidos truncados naturales, GLP-1(7-37)OH y GLP-1(7-36) NH<sub>2</sub>, se eliminan rápidamente *in vivo* y tienen semividas *in vivo* extremadamente cortas. Se sabe que la dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV) producida en forma endógena inactiva péptidos GLP-1 circulantes mediante la eliminación de residuos de histidina y alanina N-terminales y es una razón importante para la semivida corta *in vivo*.

20 Se han realizado diversas estrategias para extender la semivida de eliminación de un péptido GLP-1 o reducir el aclaramiento del péptido del organismo mientras se mantiene la actividad biológica. Una estrategia implica la fusión de un péptido GLP-1 a la porción Fc de una inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas circulantes suelen tener semividas largas *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas de IgG pueden tener una semivida en seres humanos de hasta 23 días. La porción Fc de la inmunoglobulina es responsable, en parte, por esta estabilidad *in vivo*. Las proteínas de fusión GLP-1-Fc toman ventaja de la estabilidad proporcionada por la porción Fc de una inmunoglobulina mientras se preserva la actividad biológica de la molécula de GLP-1.

25 En este sentido el documento WO 02/46227 desvela fusiones de un compuesto GLP-1 y una inmunoglobulina, como IgG1 o IgG4.

El documento WO 96/04388 desvela fusiones de un IL-4 mutante o variante y al menos un dominio constante de una inmunoglobulina humana o un fragmento de la misma.

30 Aunque esta estrategia es factible para tratamientos con GLP-1 (Véase el documento WO 02/46227), existe una preocupación general con respecto a la antigenicidad de diversas proteínas de fusión cuando se administran en repetidas ocasiones durante períodos prolongados de tiempo. Esta es una preocupación especialmente para los tratamientos con GLP-1-Fc ya que un paciente con diabetes debe ser tratado durante toda su vida una vez diagnosticada la enfermedad. Además, los tratamientos con proteínas de fusión con Fc pueden ser un problema si la porción Fc conserva funciones efectoras no deseadas.

35 La presente invención busca superar los problemas asociados con la inmunogenicidad y la actividad efectora potenciales asociadas con la administración de fusiones GLP-1-Fc mediante la identificación de proteínas de fusión GLP-1-Fc específicas que tienen menor riesgo de inducir una respuesta inmune después de la administración repetida y prolongada y que ya no tienen función efectora. Estas proteínas de fusión específicas tienen sustituciones en diferentes posiciones en la porción GLP-1 así como en la porción Fc de la molécula. Las sustituciones descritas en la presente memoria proporcionan mayor potencia, mayor estabilidad *in vivo*, eliminación de la función efectora y disminución de la probabilidad de que la molécula será reconocida por los elementos adaptativos del sistema inmunológico.

40 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporcionan proteínas de fusión heterólogas que comprenden un análogo de GLP-1 que comprende una secuencia seleccionada de:

45 a)

(SEQ ID NO:1)

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-Gly

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

b)

(SEQ ID NO:2)

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Gly

en la que Xaa<sub>8</sub> Gly se selecciona de y Val;

c)

(SEQ ID NO:3)

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-Pro

5

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

d)

(SEQ ID NO:4)

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

10

e)

(SEQ ID NO:5)

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

f)

(SEQ ID NO:6)

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly

15

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

fusionada con la porción Fc de una inmunoglobulina que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7

Ala-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-**Pro**-Cys-Pro-Ala-Pro-Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-  
Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-  
Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Phe-  
20 **Xaa**<sub>80</sub>-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-  
Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-  
Pro-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-  
Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-  
Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-  
25 His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Gly-Xaa<sub>230</sub> (SEQ ID NO:7)

en la que:

Xaa en la posición 16 es Pro o Glu;

Xaa en la posición 17 es Phe, Val o Ala;

Xaa en la posición 18 es Leu, Glu, o Ala;

Xaa en la posición 80 es Asn o Ala; y

Xaa en la posición 230 es Lys o está ausente.

- 5 El residuo de glicina C-terminal del análogo de GLP-1 está fusionado preferentemente al residuo de alanina N-terminal de la porción Fc a través de un conector peptídico que comprende una secuencia seleccionada de:

a) Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:8);

b) Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:19);

y

- 10 c) Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:21).

El conector comprende más preferentemente la secuencia de SEQ ID NO: 8.

Preferentemente, Xaa en la posición 8 del análogo de GLP-1 de la presente invención es Gly o Val.

Aún más preferentemente el análogo de GLP-1 de la presente invención comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

- 15 La proteína de fusión heteróloga de la presente invención se selecciona de: a) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P); b) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A); c) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, N297A); d) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); e) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P); f) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A); g) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, N297A); h) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); i) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P); j) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A); k) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, N297A); l) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); y las formas des-K de los mismos.

Una proteína de fusión heteróloga preferida es la forma des-K de Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A).

- 25 Más preferentemente la proteína de fusión heteróloga se selecciona de: a) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P); b) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A); c) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, N297A); d) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); e) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P); f) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A); g) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, N297A); h) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); i) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P); j) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A); k) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, N297A); l) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); y las formas des-K de los mismos.

Una proteína de fusión heteróloga preferida comprende

(a) un análogo de GLP-1 que comprende la SEQ ID NO:1

- 35 His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-Gly en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly;

(b) una porción Fc de una inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO:7

- Ala-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Phe-Xaa<sub>80</sub>-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Gly-Xaa<sub>230</sub>

en la que:

Xaa en la posición 16 es Glu;

Xaa en la posición 17 es Ala;

Xaa en la posición 18 es Ala;

Xaa en la posición 80 es Asn; y

Xaa en la posición 230 está ausente; y

- 5 (c) un conector péptido que comprende la SEQ ID NO:8

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser,

en la que la glicina N-terminal del conector péptido está fusionada directamente con el residuo de glicina C-terminal del análogo de GLP-1 y la serina C-terminal del conector péptido está fusionada directamente a la alanina N-terminal de la porción Fc.

- 10 Preferentemente, la proteína de fusión heteróloga comprende la secuencia de aminoácidos:

**HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPP  
 CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
 NYKTTTPVLDSGDFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL**

**SLG**, y tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 20.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión heteróloga para su uso como medicamento.

- 15 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión heteróloga para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus no dependiente de insulina.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión heteróloga para su uso en el tratamiento de la obesidad o la inducción de la pérdida de peso en un individuo con sobrepeso.

- 20 De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una proteína de fusión heteróloga para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus no dependiente de insulina.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una proteína de fusión heteróloga para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad o la inducción de la pérdida de peso en un individuo con sobrepeso.

- 25 De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un dímero que comprende dos proteínas de fusión heterólogas de la presente invención.

De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación que comprende una proteína de fusión heteróloga de la presente invención, que se encuentra preferentemente en forma de dímero.

- 30 La presente invención incluye también polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención, así como vectores y células hospedadoras que comprenden tales polinucleótidos. Los procedimientos de tratamiento de pacientes que sufren de diabetes mellitus no dependiente de insulina y diabetes mellitus dependiente de insulina, obesidad y otros diversos trastornos y afecciones que comprenden la administración de las proteínas de fusión heterólogas mencionadas en la presente memoria son también abarcadas por la presente invención.

- 35 Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención comprenden una porción análoga de GLP-1 y una porción de Fc. La porción análoga de GLP-1 y la porción de Fc comprenden sustituciones de la secuencia nativa de GLP-1 y la secuencia de IgG4 humana, respectivamente, que proporcionan la proteína con mayor potencia y estabilidad *in vivo* en comparación con GLP-1 nativo o análogos de GLP-1 no fusionados a una secuencia de Fc mientras que disminuyen el potencial de inducir la formación de anticuerpos después de la administración prolongada y repetida en seres humanos.
- 40

La GLP-1 nativa es procesada *in vivo* de tal manera que los 6 primeros aminoácidos se separan de la molécula. Por lo tanto, por la costumbre en la técnica, al amino terminal de GLP-1 se le ha asignado el número 7 y al carboxi

terminal, el número 37. Los otros aminoácidos en el polipéptido se numeran consecutivamente como se muestra en la SEQ ID NO: 9. Por ejemplo, la posición 8 es la alanina y la posición 22 es glicina. El péptido procesado puede ser modificado adicionalmente *in vivo* de tal manera que el residuo de glicina C-terminal es eliminado y reemplazado con un grupo amida. De este modo, GLP-1(7-37)OH y GLP-1(7-36)amida representan las dos formas nativas de la molécula. GLP-1(7-37)OH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9:

<sup>7</sup>His-Ala-Glu-<sup>10</sup>Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-<sup>15</sup>Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-<sup>20</sup>Leu-Glu-Gly-  
Gln-Ala-<sup>25</sup>Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-<sup>30</sup>Ala-Trp-Leu-Val-Lys-<sup>35</sup>Gly-Arg-<sup>37</sup>Gly  
(SEQ ID NO:9)

La porción análoga de GLP-1 de la proteína de fusión heteróloga comprende tres sustituciones primarias en las posiciones 8, 22 y 36 con respecto a GLP-1(7-37) nativo. La sustitución en la posición 8 reduce la velocidad a la que la enzima endógena dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV) inactiva el análogo. DPP-IV escinde la GLP-1 nativa entre los aminoácidos 2do. y 3ero. (entre las posiciones 8 y 9) y la molécula resultante es menos activa. Por lo tanto, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención son resistentes a DPP-IV. La sustitución en la posición 22 reduce el potencial de la molécula de agregarse y aumenta su potencia. La sustitución en la posición 36 en el contexto del análogo con cambios en 8 y 22 así como en el contexto de la proteína de fusión completa reduce el riesgo de que la proteína de fusión induzca una respuesta inmune neutralizante después de la administración repetida y prolongada en seres humanos.

El evento central en la generación de respuestas inmunes humoral y mediada por células es la activación y expansión clonal de células T auxiliares (T<sub>H</sub>). La activación de células T<sub>H</sub> es iniciada por la interacción del complejo receptor de células T (TCR)-CD3 con un péptido antigénico procesado unido a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II en presencia de una célula presentadora de antígeno (APC). La interacción de una célula T<sub>H</sub> con el antígeno inicia una cascada de eventos bioquímicos que induce a la célula T<sub>H</sub> en reposo a entrar en el ciclo celular (transición G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub>). Las células T activadas progresan a través del ciclo celular, proliferando y diferenciándose en células de memoria o células efectoras.

La secuencia siguiente fue analizada para identificar posibles epítomos:

**His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-  
Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-  
Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-  
Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro (SEQ ID NO:10)**

Esta secuencia es una secuencia de análogo de GLP-1 con cambios en las posiciones 8 y 22 con respecto a la secuencia nativa seguida por dos copias de una secuencia de un conector rico en G seguida por los primeros 10 aminoácidos de una región Fc derivada de IgG4 humana. Epítomo como se usa en la presente memoria se refiere a una región de una molécula de proteína a la cual puede unirse un anticuerpo. Un epítomo inmunogénico se define como la parte de la proteína que provoca una respuesta de anticuerpos cuando la proteína completa es el inmunógeno. El mapeo de epítomos implicó la exploración de las secuencias utilizando el deslizamiento de una ventana de nueve aminoácidos junto con técnicas avanzadas de análisis estadístico para extraer la información contenida en estos patrones. Se utilizó un paquete de software patentado conocido como EpiMatrix™ para analizar la secuencia e identificar péptidos que tienen alta probabilidad de provocar una respuesta inmune cuando se presentan a las células T. Se usaron ocho alelos muy comunes en el análisis de la interacción del receptor de MHC de Clase II. Estos alelos incluían DRB1\*0101, DRB1\*0301, DRB1\*0401, DRB1\*0701, DRB1\*0801, DRB1\*1101, DRB1\*1301, y DRB1\*1501.

Se predijo un epítomo potente ubicado en la unión del C-terminal de la porción análoga de GLP-1 y el comienzo del conector. La secuencia de este epítomo es Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 11) que interactúa con DRB 1 \*0801. La presente invención abarca el descubrimiento de que este epítomo puede ser eliminado cambiando el C-terminal del análogo de GLP-1 a una de las siguientes secuencias: Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 12); Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:13); Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO:14); Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO:15); Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO:16); y Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly (SEQ ID NO:17).

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención contienen una porción Fc que deriva de IgG4 humana, pero comprende uno o más sustituciones en comparación con la secuencia humana de tipo salvaje. Como se usa en la presente memoria, la porción Fc de una inmunoglobulina tiene el significado que se le dio al término en el campo de la inmunología. Específicamente, este término se refiere a un fragmento de anticuerpo que no contiene las dos regiones de unión al antígeno (los fragmentos Fab) del anticuerpo. La porción Fc se compone de la región constante

de un anticuerpo a partir de dos cadenas pesadas, que se asocian a través de interacciones no covalentes y enlaces disulfuro. La porción Fc puede incluir las regiones bisagra y se extiende a través de los dominios CH2 y CH3 del C-terminal del anticuerpo. La porción Fc puede incluir además uno o más sitios de glicosilación.

Hay cinco tipos de inmunoglobulinas humanas con diferentes funciones efectoras y propiedades farmacocinéticas. IgG es el más estable de los cinco tipos que tienen una semivida en suero en los seres humanos de aproximadamente 23 días. Hay cuatro subclases de IgG (G1, G2, G3 y G4) cada una de ellas tiene diferentes funciones biológicas conocidas como funciones efectoras. Estas funciones efectoras generalmente son mediadas a través de la interacción con el receptor de Fc (FcγR) o por unión a C1q y fijación del complemento. La unión a FcγR puede llevar a una citólisis mediada por células dependiente de anticuerpos, mientras que la unión a factores del complemento puede conducir a la lisis celular mediada por el complemento. En el diseño de proteínas heterólogas de fusión con Fc en las que la porción Fc está siendo utilizada exclusivamente por su capacidad de extender la semivida, es importante reducir al mínimo cualquier función efectora. Por lo tanto, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención derivan de la región FC de la IgG4 humana debido a su reducida capacidad de unirse a FcγR y a factores del complemento en comparación con otros subtipos de IgG. Se ha demostrado, sin embargo, que la IgG4 depleta células diana en los seres humanos [Isaacs et al., (1996) Clin. Exp. Immunol. 106:427-433]. Debido a que las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención localizan células beta en el páncreas para inducir la expresión de insulina, la utilización de una región derivada de IgG4 en una proteína de fusión con Fc podría iniciar una respuesta inmune contra las células beta pancreáticas a través de la interacción de la proteína de fusión con el receptor de GLP-1 presente en las células beta del páncreas. Por lo tanto, la región Fc de IgG4 que forma parte de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención contiene sustituciones que eliminan la función efectora. La porción Fc de IgG4 de las proteínas de fusión de la presente invención pueden contener una o más de las siguientes sustituciones: sustitución de prolina por glutamato en el residuo 233, alanina o valina por fenilalanina en el residuo 234 y alanina o glutamato por leucina en el residuo 235 (numeración de la UE, Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, NIH Publication no. 91-3242). Estos residuos se corresponden con las posiciones 16, 17 y 18 en la SEQ ID NO: 7. Además, eliminar el sitio de glicosilación N-unido en la región Fc de IgG4 mediante la sustitución de Ala por Asn en el residuo 297 (numeración de UE) que corresponde a la posición 80 de la SEQ ID NO: 7 es otra manera de asegurarse de que se elimina la actividad efectora residual en el contexto de una proteína de fusión heteróloga.

Además, la porción Fc de IgG4 de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención contienen una sustitución que estabiliza la formación de dímeros de cadena pesada y previene la formación de cadenas de FC de una mitad de IgG4. Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención preferentemente existen como dímeros unidos por enlaces disulfuro y diversas interacciones no-covalentes. La IgG4 de tipo salvaje contiene un motivo Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys (SEQ ID NO: 18) a partir del residuo 224 (numeración de la UE). Este motivo en una sola cadena FC de análogo de GLP-1 forma enlaces disulfuro con el motivo correspondiente en otra cadena Fc de análogo de GLP-1. Sin embargo, la presencia de serina en el motivo provoca la formación de proteínas de fusión de una sola cadena. La presente invención incluye proteínas de fusión con Fc heterólogas en las que la secuencia de IgG4 es modificada además de tal manera que la serina en la posición 228 (numeración de la UE) es sustituida por prolina (residuo de aminoácido 11 de la SEQ ID NO: 7).

El residuo de lisina C-terminal en la molécula nativa puede ser eliminado en la porción de Fc derivada de IgG4 de las proteínas de fusión heterólogas discutidas en la presente memoria (posición 230 de la SEQ ID NO: 7; la lisina eliminada se conoce como des-K). Las proteínas de fusión expresadas en algunos tipos de células (como las células NS0) en la que la lisina es codificada por el codón C-terminal son heterogéneas en cuanto a que una parte de las moléculas tienen lisina como el aminoácido C-terminal y una parte tienen la lisina eliminada. La eliminación se debe a la acción de una proteasa durante la expresión en algunos tipos de células de mamíferos. Por lo tanto, para evitar esta heterogeneidad se prefiere que los constructos de expresión de fusión de FC carezcan de un codón C-terminal para lisina.

Se prefiere que el aminoácido C-terminal de la porción del análogo de GLP-1 mencionado en la presente memoria se fusione al N-terminal de la porción Fc del análogo de IgG4 a través de un conector rico en glicina. La función y la estabilidad *in vivo* de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden optimizarse mediante la adición de conectores péptidos pequeños para evitar interacciones de dominios no deseadas. Además, un conector rico en glicina proporciona cierta flexibilidad estructural de modo que la porción del análogo de GLP-1 puede interactuar de manera productiva con el receptor de GLP-1 en células diana como las células beta del páncreas. Estos conectores, sin embargo, pueden aumentar significativamente el riesgo de que la proteína de fusión sea inmunogénica *in vivo*. Por lo tanto, es preferente que la longitud sea no mayor que lo necesario para evitar interacciones de dominios no deseadas y/u optimizar la actividad biológica y/o la estabilidad. El conector rico en glicina preferido comprende la secuencia: Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 8). Aunque pueden utilizarse más copias de este conector en las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención, se prefiere usar una sola copia de este conector para minimizar el riesgo de inmunogenicidad asociada con la administración prolongada y repetida.

Las proteínas heterólogas de fusión GLP-1-Fc de preferencia de la presente invención incluyen las siguientes proteínas: Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A,

L235A), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, N297A), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, N297A), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, N297A), y las formas Val<sup>8</sup> y des-K de todas las anteriores.

La nomenclatura utilizada en la presente memoria para referirse a proteínas de fusión heterólogas específicas se define de la siguiente manera: las sustituciones específicas para la porción de GLP-1 de la proteína de fusión se indican usando el aminoácido específico que se sustituye seguido por el número de residuo. GLP-1(7-37) indica que la porción de GLP-1 de la proteína de fusión madura empieza con His en la posición 7 y termina con Gly en la posición 37. L se refiere a un conector con la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 8). El número inmediatamente anterior a L se refiere al número de conectores que separa la porción de GLP-1 de la porción de Fc. Un conector especificado como 1.5L se refiere a la secuencia Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:19). IgG4 se refiere a un análogo de la secuencia de Fc de IgG4 humana especificada como SEQ ID NO: 7. Las sustituciones en la porción Fc de IgG4 de la proteína de fusión heteróloga se indican entre paréntesis. El aminoácido de tipo salvaje se especifica mediante su abreviatura común seguida por el número de posición en el contexto de la secuencia de IgG4 completa utilizando el sistema de numeración de la UE seguido por el ácido amino sustituido en esa posición especificado por su abreviatura común.

Aunque las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden fabricarse mediante una variedad de procedimientos diferentes, debido al tamaño de la proteína de fusión, se prefieren los procedimientos recombinantes. A los efectos de la presente invención, como se desvela y reivindica en la presente memoria, se definen a continuación los siguientes términos de biología molecular y abreviaturas generales.

“Pares de bases” o “pb” como se usa en la presente memoria se refiere al ADN o ARN. Las abreviaturas A, C, G y T corresponden a las formas 5'-monofosfato de los desoxirribonucleósidos (desoxi)adenosina, (desoxi)citidina, (desoxi)guanosina y timidina, respectivamente, cuando se encuentran en moléculas de ADN. Las abreviaturas U, C, G y A corresponden a las formas 5'-monofosfato de los ribonucleósidos uridina, citidina, guanosina y adenosina, respectivamente, cuando se encuentran en moléculas de ARN. En el ADN de cadena doble, un par de bases puede referirse a una asociación de A con T o C con G. En un heterodúplex ADN/ARN par de bases puede referirse a una asociación de A con U o C con G. (Véase la definición de “complementario”, *infra*.)

“Digestión” o “restricción” del ADN se refiere a la escisión catalítica del ADN con una enzima de restricción que actúa sólo en ciertas secuencias en el ADN (“endonucleasas específicas para secuencias”). Las diversas enzimas de restricción utilizadas en la presente memoria están disponibles en el comercio y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requisitos se usaron de la forma que conocería un experto en la materia. Los tampones apropiados y cantidades de sustrato para enzimas de restricción en particular son especificados por el fabricante o pueden encontrarse fácilmente en la literatura.

“Ligadura” se refiere al procedimiento de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácidos nucleicos de doble cadena. A menos que se disponga lo contrario, puede lograrse una ligadura usando tampones y condiciones conocidos con una ADN ligasa, como ADN ligasa T4.

“Plásmido” se refiere a un elemento genético extracromosómico (por lo general) auto-replicante.

“Vector de clonación de ADN recombinante”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier agente de replicación autónoma, incluyendo entre otros a plásmidos y fagos, que comprende una molécula de ADN a las que pueden haberse añadido uno o más segmentos adicionales de ADN.

“Vector de expresión de ADN recombinante”, como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier vector de clonación de ADN recombinante en el que se ha incorporado un promotor para controlar la transcripción del ADN insertado.

“Transcripción” se refiere al procedimiento mediante el cual se transfiere la información contenida en una secuencia de nucleótidos de ADN a una secuencia de ARN complementario.

“Transfección” se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula hospedadora independientemente de que, en efecto, se exprese cualquier secuencia de codificación. Existen numerosos procedimientos de transfección que son conocidos por el experto, por ejemplo, coprecipitación con fosfato de calcio, transfección con liposomas y electroporación. Una transfección exitosa se reconoce generalmente cuando se produce una indicación de la operación de este vector dentro de la célula hospedadora.

“Transformación” se refiere a la introducción de ADN en un organismo que modo que el ADN puede ser replicado, ya sea como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica. Los procedimientos de transformación de hospedadores bacterianos y eucariotas son bien conocidos en la técnica, muchos de estos procedimientos, como inyección nuclear, fusión de protoplastos o por tratamiento con calcio usando cloruro de calcio



se resumen en J. Sambrook, et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989). En general, cuando se introduce ADN en una levadura se utiliza el término transformación en oposición al término transfección.

“Traducción” como se usa en la presente memoria se refiere al procedimiento mediante el cual se utiliza la información genética del ARN mensajero (ARNm) para especificar y dirigir la síntesis de una cadena polipeptídica.

5 “Vector” se refiere a un compuesto de ácido nucleico utilizado para la transfección y/o transformación de células en la manipulación de genes que contiene una secuencia de polinucleótidos que corresponde a moléculas de proteína adecuadas las que cuando se combinan con secuencias de control apropiadas confieren propiedades específicas en la célula hospedadora a ser transfectada y/o transformada. Los plásmidos, virus y bacteriófagos son vectores adecuados. Los vectores artificiales son construidos mediante el corte y la unión de moléculas de ADN de diferentes  
10 orígenes utilizando enzimas de restricción y ligasas. El término “vector” como se usa en la presente memoria incluye vectores de clonación de ADN recombinante y vectores de expresión de ADN recombinante.

“Complementario” o “complementariedad”, como se usa en la presente memoria, se refiere a pares de bases (purinas y pirimidinas) que se asocian a través de enlaces de hidrógeno en un ácido nucleico de doble cadena. Los siguientes pares de bases son complementarios: guanina y citosina; adenina y timina; y adenina y uracilo.

15 “Cebador” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona como un sustrato para iniciar la elongación enzimática o sintética.

“Promotor” se refiere a una secuencia de ADN que dirige la transcripción del ADN a ARN.

“Sonda” se refiere a un compuesto de ácido nucleico o a un fragmento del mismo, que se hibrida con otro compuesto de ácido nucleico.

20 “Secuencia líder” se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede ser removida enzimática o químicamente para producir el polipéptido de interés deseado.

“Secuencia señal de secreción” se refiere a una secuencia de aminoácidos generalmente presente en la región N-terminal de un polipéptido más grande que funciona iniciando la asociación de ese polipéptido con compartimientos de la membrana celular como el retículo endoplásmico y la secreción de polipéptidos a través de la membrana  
25 plasmática.

Las proteínas IgG4 humanas de tipo salvaje pueden obtenerse de una variedad de fuentes. Por ejemplo, estas proteínas pueden obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de células que expresan el ARNm de interés a un nivel detectable. Las bibliotecas pueden ser examinadas con sondas diseñadas utilizando el ADN o la  
30 secuencia de proteína publicados de la proteína de interés. Por ejemplo, las regiones constantes de cadena liviana o pesada de inmunoglobulinas se describen en Adams, et al. (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Goughet, et al. (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby, et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6027-6031; Rice et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7862-7862; Falkner, et al. (1982) *Nature* 298:286-288; y Morrison, et al. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256.

35 El examen de una biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada puede llevarse a cabo mediante procedimientos estándares, como se describe en Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989). Un medio alternativo para aislar un gen que codifica una proteína inmunoglobulina es el uso de metodología de PCR [Sambrook et al, supra; Dieffenbach et al, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1995)]. Los cebadores de PCR pueden ser diseñados en base a secuencias publicadas.

40 En general, las secuencias de tipo salvaje de longitud completa clonadas a partir de una biblioteca en particular pueden servir como plantilla para crear los fragmentos análogos de Fc de IgG4 de la presente invención que retienen la capacidad de conferir una semivida plasmática más larga en el análogo de GLP-1 que es parte de la proteína de fusión. Los fragmentos análogos de Fc de IgG4 pueden generarse utilizando técnicas de PCR con  
45 cebadores diseñados para hibridar con secuencias correspondientes a los extremos deseados del fragmento. Los cebadores de PCR también pueden diseñarse para crear sitios de enzimas de restricción a fin de facilitar la clonación en vectores de expresión.

El ADN que codifica los análogos de GLP-1 de la presente invención puede fabricarse mediante una variedad de procedimientos diferentes, incluyendo procedimientos de clonación como los descritos anteriormente así como ADN sintetizado químicamente. La síntesis química puede ser interesante dada la corta longitud del péptido codificado. La  
50 secuencia de aminoácidos de GLP-1 ha sido publicada, así como la secuencia del gen preproglucagón. [Lopez, et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 80:5485-5489; Bell, et al. (1983) *Nature*, 302:716-718; Heinrich, G., et al. (1984) *Endocrinol.* 115:2176-2181; Ghigliione, M., et al. 1984) *Diabetologia* 27:599-600]. Por lo tanto, los cebadores pueden ser diseñados en base a la secuencia nativa para generar ADN que codifica los análogos de GLP-1 descritos en la presente memorias.

5 El gen que codifica una proteína de fusión puede ser construido ligando ADN que codifica un análogo de GLP-1 en un marco a ADN que codifica las proteínas de Fc de IgG Fc descritas en la presente memoria. El ADN que codifica GLP-1 de tipo salvaje y fragmentos Fc de IgG4 puede ser mutado antes de la ligadura o en el contexto de un ADNc que codifica una proteína de fusión completa. Una variedad de técnicas de mutagénesis son bien conocidas en la técnica. El gen que codifica el análogo de GLP-1 y el gen que codifica la proteína análoga de Fc de IgG4 también pueden unirse en un marco a través del ADN que codifica un conector péptido rico en G. Una secuencia de ADN preferida que codifica una de las proteínas de fusión heterólogas preferidas de la presente invención, Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, des K), se presenta como SEC ID NO: 20:

**CACGGCGAGGGCACCTTCACTCCGACGTGTCCTCTATCTCGAGGAGCAGG  
 CCGCCAAGGAATTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCGGCGGGTGGTGGTGG  
 CTCCGGAGGCGGCGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGCGCTGAGTCCAAATATGGT  
 CCCCCATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGACCATCAGTCTT  
 CCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGG  
 TCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA  
 CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG  
 GAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA  
 GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC  
 CCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGC  
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT  
 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT  
 GGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT  
 GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGC  
 AGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC  
 ACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT (SEQ ID NO:20)**

10 Las células hospedadoras son transfectadas o transformadas con vectores de expresión o clonación descritos en la presente memoria para la producción de proteínas de fusión heterólogas y cultivadas en medios de cultivo convencionales modificados según sea apropiado para la inducción de promotores, la selección de transformantes, o la amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, como medios, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto sin experimentación indebida. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook, et al., supra. Los procedimientos de transfección son conocidos para el experto, por ejemplo, CaPO<sub>4</sub> y electroporación. Los aspectos generales de transformaciones de sistemas hospedadores en células de mamíferos se han descrito en la Patente de EE.UU. Núm. 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo comúnmente de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen et al., J Bact. 130(2): 946-7 (1977) y Hsiao et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (8): 3829-33 (1979). Sin embargo, también pueden utilizarse otros procedimientos para la introducción de ADN en células, como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policonaciones, por ejemplo, polibreno o poliomitina. Para diversas técnicas para la transformación de células de mamíferos, véase Keown, et al, Methods in Enzymology 185: 527-37 (1990) y Mansour, et al, Nature 336 (6197): 348-52 (1988).

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión del ácido nucleico (por ejemplo, ADN) en los vectores de la presente memoria incluyen células de levadura o eucariotas superiores.

Los microbios eucariotas como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores de proteínas de fusión. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior utilizado comúnmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse, Nature 290: 140-3 (1981); EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1995]; hospedadores *Muyveromyces* [Patente de EE.UU. Núm. 4.943.529; Fler, et al., Bio/Technology 9(10): 968-75 (1991)] como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574) [de Louvencourt et al., J. Bacteriol. 154(2): 737-42 (1983)]; *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906) [Van den Berg et al., Bio/Technology 8(2): 135-9 (1990)]; *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070) [Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. 28(4): 265-78 (1988)]; *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* [Case, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(10): 5259-63 (1979)];

Schwanniomyces como Schwanniomyces occidentalis (EP 394.538 publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos como, por ejemplo, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y hospedadores Aspergillus como A. nidulans [Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 112(1): 284-9 (1983)]; Tilburn, et al., Gene 26(2-3): 205-21 (1983); Yelton, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(5): 1470-4 (1984)] y A. niger [Kelly and Hynes, EMBO J. 4(2): 475-9 (1985)]. Las levaduras metilótropicas se seleccionan de los géneros que consisten de Hansenula, Candida, Klöeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis, y Rhodotorula. Una lista species específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras puede encontrarse en C. Antony, The Biochemistry of Methylotrophs 269 (1982).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de las proteínas de fusión de la presente invención son derivadas de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos como Drosophila S2 y Spodoptera sp, Spodoptera high5, así como células vegetales. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles incluyen células de mieloma NSO, células de ovario de hámster chino (CHO), SP2, y COS. Los ejemplos más específicos incluyen línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS- 7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano [células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham, et al., J. Gen Virol., 36(1): 59-74 (1977)]; células de ovario de hámster chino/-DHFR [CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(7): 4216-20 (1980)]; células de Sertoli de ratón [TM4, Mather, Biol. Reprod. 23(1):243-52 (1980)]; células de pulmón humano (W138. ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Una línea celular preferida para la producción de las proteínas de fusión Fc de la presente invención es la línea celular de mieloma NSO disponible en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, catálogo # 85110503) y descrita en Galfre, G. y Milstein, C. ((1981) Methods in Enzymology 73(13):3-46, y Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures, Academic Press, N.Y., N.Y.).

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden ser producidas en forma recombinante directamente, o como una proteína que tiene una secuencia señal u otras secuencias adicionales que crean un sitio de escisión específico en el N-terminal de la proteína de fusión madura. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica la proteína de fusión que se inserta en el vector. Para la secreción en levaduras la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, el líder de factor alfa (incluyendo líderes de factor cc de Saccharomyces y Kluyveromyces, este último descrito en la patente de EE.UU. Núm. 5.010.182), o el líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de C. albicans (EP 362.179), o la señal descrita en WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, pueden utilizarse secuencias señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, como secuencias señales de polipéptidos secretados de la misma especie o relacionadas, así como líderes de secreción viral.

Los vectores de clonación y de expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. Los vectores de expresión y clonación contendrán comúnmente un gen de selección, también denominado un marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias autotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para Bacilos.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, como DHFR o timidina quinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe [Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77(7): 4216-20 (1980)]. Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen trp1 presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb, et al., Nature 282(5734): 39-43 (1979); Kingsman, et al., Gene 7(2): 141-52 (1979); Tschumper, et al., Gene 10(2): 157-66 (1980)]. El gen trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC Núm. 44076 o PEPC1 [Jones, Genetics 85: 23-33 (1977)].

Los vectores de expresión y de clonación por lo general contienen un promotor operativamente unido a la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión para la síntesis directa de ARNm. Los promotores reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales son bien conocidos. Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman, et al., J. Biol. Chem. 255(24): 12073-80 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess et al, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 (1968); Holland, Biochemistry 17(23): 4900-7 (1978)], como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucoasa isomerasa y glucoquinasa. Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras se describen más detalladamente en EP 73.657. La transcripción de ARNm que codifica proteínas de fusión de vectores en células hospedadoras de mamífero pueden controlarse, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como virus del

polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y virus de Simio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, a condición de que estos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

5 La transcripción de un polinucleótido que codifica una proteína de fusión por eucariotas superiores puede aumentarse mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos del ADN con acción cis-, por lo general de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Se conocen actualmente numerosas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -cetoproteína, e insulina). Comúnmente, sin embargo, se utilizará un  
10 potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede ser empalmado en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia de codificación de la proteína de fusión pero está situado preferentemente en un sitio 5' del promotor.

15 Los vectores de expresión utilizados en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, vegetales, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Estas secuencias están comúnmente disponibles en las regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3' de los ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la  
20 porción no traducida del ARNm que codifica la proteína de fusión.

Pueden recuperarse diversas formas de una proteína de fusión del medio de cultivo o de lisados de células hospedadoras. Si están unidas a la membrana, pueden ser liberadas de esta utilizando una solución detergente apropiada (por ejemplo, Triton X-100) o por escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión de una proteína de fusión pueden ser lisadas por diversos medios físicos o químicos, como un ciclo de congelación-  
25 descongelación, sonicación, disrupción mecánica, o agentes de lisis celular.

Una vez que las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención se expresan en la célula hospedadora apropiada, los análogos pueden ser aislados y purificados. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación apropiados: fraccionamiento en carboximetilcelulosa; filtración en gel como Sephadex G-75; resina de intercambio aniónico como DEAE o Mono-Q; intercambio catiónico como CM o Mono-S; columnas quelantes de metales para unir formas con epítopos marcados del polipéptido; HPLC de fase inversa; cromatografía de  
30 cromatografía de intercambio; gel de sílice; precipitación con etanol; y precipitación con sulfato de amonio.

Pueden emplearse diversos procedimientos de purificación de proteínas y estos procedimientos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990) and Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s)  
35 dependerá(n) de la naturaleza de los procedimientos de producción usados y de la proteína de fusión producida en particular. Por ejemplo, las proteínas de fusión que comprenden un fragmento Fc pueden ser purificadas efectivamente utilizando una matriz de afinidad de Proteína A o Proteína G. Pueden utilizarse tampones de pH bajo o alto para la elución de la proteína de fusión de la matriz de afinidad. Las condiciones de elución suaves ayudarán a prevenir la desnaturalización irreversible de la proteína de fusión.

40 Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden formularse con uno o más excipientes. Las proteínas de fusión de la presente invención pueden combinarse con un tampón aceptable desde el punto de vista farmacéutico, y ajustarse el pH para proporcionar buena estabilidad y un pH aceptable para la administración como en la administración parenteral. Opcionalmente, pueden añadirse uno o más agentes antimicrobianos aceptables desde el punto de vista farmacéutico. El meta-cresol y el fenol son los agentes microbianos aceptables desde el  
45 punto de vista farmacéutico preferidos. Pueden añadirse una o más sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico para ajustar la fuerza iónica o la tonicidad. Pueden añadirse uno o más excipientes para ajustar aún más la isotonicidad de la formulación. La glicerina es un ejemplo de un excipiente para ajustar la isotonicidad. Aceptable desde el punto de vista farmacéutico significa adecuado para su administración a un ser humano u otro animal y, por lo tanto, que no contiene elementos tóxicos o contaminantes indeseables y no interfiere con la  
50 actividad de los compuestos activos en el mismo.

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden ser formuladas como una formulación en solución o como un polvo liofilizado que puede reconstituirse con un diluyente apropiado. Una forma de dosificación liofilizada es aquella en la que la proteína de fusión es estable, con o sin la capacidad tampón para mantener el pH de la solución durante la vida útil en uso prevista del producto reconstituido. Se prefiere que la solución que  
55 comprende las proteínas de fusión heterólogas discutidas en la presente memoria antes de la liofilización sea sustancialmente isotónica para permitir la formación de soluciones isotónicas después de la reconstitución.

Las formas salinas aceptables desde el punto de vista farmacéutico de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención están dentro del alcance de la invención. Los ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición de ácidos son ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido

sulfúrico, ácido fosfórico, y similares, y ácidos orgánicos como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético, y similares. Las sales de adición de ácido preferidas son las formadas con ácidos minerales como ácido clorhídrico y ácido bromhídrico.

- 5 Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de bases inorgánicas, como amonio o hidróxidos de metales alcalinos o alcalino-térreos, carbonatos, bicarbonatos, etc. Estas bases útiles para preparar las sales de esta invención incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio, etc.

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención tienen actividad biológica. La actividad biológica se refiere a la capacidad de la proteína de fusión de unirse y activar el receptor de GLP-1 *in vivo* y obtener una respuesta. Las respuestas incluyen entre otras secreción de insulina, supresión de glucagón, inhibición del apetito, pérdida de peso, inducción de saciedad, inhibición de apoptosis, inducción de la proliferación de las células beta del páncreas, y diferenciación de las células beta del páncreas. Un número representativo de proteínas de fusión GLP-1 fueron analizadas en cuanto a la actividad *in vitro* así como *in vivo*. Los ejemplos 1 y 2 presentan la actividad *in vitro* sobre la base de la capacidad de la proteína de fusión de interactuar con el receptor de GLP-1 humano y activarlo. En ambos grupos de experimentos se usaron células HEK293 que sobre-expresan el receptor de GLP-1 humano. La activación del receptor de GLP-1 en estas células provoca la activación de adenilil ciclasa que a su vez induce la expresión de un gen reportero impulsado por un elemento de respuesta de AMP cíclico (CRE). El ejemplo 1 (tabla 1) proporciona datos en los que el gen reportero es betalactamasa, y el ejemplo 2 (tabla 2) proporciona datos en los que el gen reportero es luciferasa. El ejemplo 3 proporciona datos generados después de la administración de una de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención a ratas. En conjunto, los datos muestran que las proteínas de fusión son capaces de unirse y activar el receptor de GLP-1 y parecen más potentes *in vitro* que Val<sup>6</sup>-GLP-1(7-37)OH. Además, los datos generados en ratas indican que las proteínas de fusión son activas *in vivo* y tienen una semivida más larga que GLP-1 nativa.

La administración de las proteínas de fusión heterogéneas puede ser por cualquier vía que el médico experto conoce que es efectiva. La vía parenteral periférica es uno de estos procedimientos. La administración parenteral se entiende comúnmente en la literatura médica como la inyección de una forma de dosificación en el organismo con una jeringa estéril o algún otro dispositivo mecánico como una bomba de infusión. Las vías parenterales periféricas pueden incluir vías de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención también pueden estar disponibles a la administración por vía oral, rectal, nasal, o respiratoria inferior, que son vías no parenterales. De estas vías no parenterales, la vía respiratoria inferior y la vía oral son las preferidas.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden utilizarse para tratar una amplia variedad de enfermedades y condiciones. Las proteínas de fusión de la presente invención ejercen principalmente sus efectos biológicos al actuar en un receptor conocido como el "receptor de GLP-1." Los individuos con enfermedades y/o condiciones que responden favorablemente a la estimulación del receptor de GLP-1 o a la administración de compuestos de GLP-1 pueden por lo tanto ser tratados con las proteínas de fusión de GLP-1 de la presente invención. Se dice que estos individuos "necesitan de tratamiento con compuestos GLP-1" o "necesitan la estimulación del receptor de GLP-1". Se incluyen individuos con diabetes no dependiente de insulina, diabetes dependiente de insulina, accidente cerebrovascular (véase el documento WO 00/16797), infarto de miocardio (véase el documento WO 98/08531), obesidad (véase el documento WO 98/19698), cambios catabólicos después de la cirugía (véase la Patente de EE.UU. Núm. 6.006.753), dispepsia funcional y síndrome de intestino irritable (véase el documento WO 99/64060). También se incluyen individuos que requieren tratamiento profiláctico con un compuesto GLP-1, por ejemplo, individuos en riesgo de desarrollar diabetes no dependiente de insulina (véase el documento WO 00/07617). Los individuos con alteración de la tolerancia a la glucosa o alteración de la glucosa en ayunas, los individuos cuyo peso corporal es de aproximadamente el 25% por encima del peso corporal normal para la altura y la estructura corporal del individuo, los individuos con pancreatometomía parcial, los individuos que tienen uno o más padres con diabetes no dependiente de insulina, los individuos que han tenido diabetes gestacional y los individuos que han tenido pancreatitis aguda o crónica están en riesgo de desarrollar diabetes no dependiente de insulina.

Una cantidad efectiva de las proteínas de fusión GLP-1-Fc descritas en la presente memoria es la cantidad que da como resultado un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado sin causar efectos secundarios inaceptables cuando se administra a un individuo que necesita estimulación del receptor de GLP-1. Un "efecto terapéutico deseado" incluye uno o más de los siguientes: 1) una mejora de el/los síntomas(s) asociado(s) con la enfermedad o condición; 2) un retraso en el inicio de los síntomas asociados con la enfermedad o condición; 3) aumento en la longevidad en comparación con la ausencia de tratamiento; y 4) mayor calidad de vida en comparación con la ausencia del tratamiento. Por ejemplo, una "cantidad efectiva" de una proteína de fusión GLP-1-Fc para el tratamiento de la diabetes es la cantidad que resultaría en un mayor control de la concentración de glucosa en la sangre que en ausencia de tratamiento, lo que resulta en un retraso en el inicio de complicaciones de la diabetes como retinopatía, neuropatía o enfermedad renal. Una "cantidad efectiva" de una proteína de fusión GLP-1-Fc para la prevención de la diabetes es la cantidad que podría retrasar, en comparación con la ausencia de tratamiento, la aparición de niveles elevados de glucosa en la sangre que requieren tratamiento con fármacos anti-hipoglucemiantes como sulfonil ureas, tiazolidindionas, insulina y/o bisguanidinas.

La dosis de proteína de fusión efectiva para normalizar la glucosa en la sangre del paciente dependerá de una serie de factores, entre los que se incluyen, sin limitación, el sexo, peso y edad del individuo, la severidad de la incapacidad para regular la glucosa en la sangre, la vía de administración y la biodisponibilidad, el perfil farmacocinético de la proteína de fusión, la potencia y la formulación. Las dosis pueden estar en el intervalo de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal, preferentemente en el intervalo de 0,05 a 0,5 mg/kg de peso corporal.

Se prefiere que las proteínas de fusión de la presente invención se administren una vez cada dos semanas o una vez a la semana. Dependiendo de la enfermedad a tratar, puede ser necesaria la administración de la proteína de fusión con mayor frecuencia como dos a tres veces a la semana.

La presente invención se describirá ahora sólo a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a los siguientes Ejemplos.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1 - Ensayo de activación del receptor GLP-1 *in vitro***

Se siembran células HEK-293 que expresan el receptor de GLP-1 humano, utilizando un sistema CRE-Blam, a 20.000 a 40.000 células/pocillo/100 µl de medio DMEM con FBS 10% en una placa de 96 pocillos de color negro revestidos con poli-D-lisina, de fondo transparente. El día después de la siembra, se retira el medio y se añaden 80 µl de medio DMEM libre de plasma. En el tercer día después de la siembra, se añade 20 µl de medio DMEM libre de plasma con BSA 0,5% conteniendo diferentes concentraciones de diversas proteínas de fusión heterólogas GLP-1-Fc a cada pocillo para generar una curva dosis-respuesta. Por lo general, se utilizan catorce diluciones que contienen proteína de fusión heteróloga GLP-1 FC 3 nanomolar a 30 nanomolar para generar una curva dosis-respuesta a partir de la cual puedan determinarse valores de EC<sub>50</sub>. Después de 5 horas de incubación con la proteína de fusión, se añaden 20 µl de sustrato de β-lactamasa (CCF2/AM, PanVera LLC) y se continúa la incubación durante 1 hora, pasada la cual se determina la fluorescencia en un equipo Cytofluor. El ensayo se describe con más detalle en Zlokarnik, et al. (1998), Science, 278:84-88. Se examinan varias proteínas de fusión GLP-1-Fc y los valores de EC<sub>50</sub> son representados en la Tabla 1. Los valores son relativos a los valores determinados para Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH que se procesa como un control interno con cada experimento.

Tabla 1

Compuesto	Actividad	Desviación Estándar
Val <sup>8</sup> -GLP-1:	100%	
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A):	301%	99
Gly-Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A):	314%	45
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A):	468%	120
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -Gly <sup>36</sup> -GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A):	441%	35

#### **Ejemplo 2 - Ensayo de activación del receptor GLP-1 *in vitro***

Se siembran células HEK-293 que expresan en forma estable el receptor de GLP-1 humano, utilizando un sistema de CRE-Luciferasa, a 30.000 células/pocillo/80 µl de medio DMEM F12 bajo en suero en placas de 96 pocillos. El día después de la siembra, alícuotas de 20 µl de la proteína de ensayo disuelta en BSA 0,5% se mezclan e incuban con las células durante 5 horas. Por lo general, se preparan 12 diluciones que contienen de 3 pM a 3 nM a una concentración 5X para cada proteína de prueba antes de la adición a las células para generar una curva dosis-respuesta a partir de la cual se determinan los valores de EC<sub>50</sub>. Después de la incubación, se añade 100 µl de reactivo de Luciferasa directamente a cada placa y se mezcla suavemente durante 2 minutos. Las placas se colocan en un luminómetro Tri-lux y se calcula la luz de salida que resulta de la expresión de luciferasa. Se examinan diversas proteínas de fusión GLP-1-Fc y los valores de EC<sub>50</sub> son representados en la Tabla 2. Los valores son relativos a valores determinados para Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH que se procesa como un control interno con cada experimento. Debido a que las proteínas de fusión examinadas a continuación son dímeros, los valores se corrigen teniendo en cuenta una diferencia de dos veces en la molaridad.

Tabla 2

Compuesto	Actividad	Desviación Estándar
Val <sup>8</sup> -GLP-1:	100%	
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A):	535%	240
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A):	595%	43
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A):	1119%	128
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -Gly <sup>36</sup> -GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A):	398%	62
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -Gly <sup>36</sup> -GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A):	417%	140

**Ejemplo 3 Prueba intravenosa de tolerancia a la glucosa en ratas**

5 La proteína de fusión con Fc, Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), se evalúa en una prueba de tolerancia a la glucosa por vía intravenosa (IVGTT) en ratas. Al menos cuatro ratas están incluidas en cada uno de los tres grupos. El Grupo I recibe vehículo (tabla 3), el Grupo II recibe 1,79 mg/kg de Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) como una única inyección subcutánea (tabla 4), y el Grupo III recibe 0,179 mg/kg de Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) como una única inyección subcutánea (tabla 5). Las ratas son inyectadas por vía subcutánea en la mañana del Día 1. Veinticuatro horas después de la primera inyección, se infunde 1 µl de glucosa (D50) por gramo de peso corporal de rata como un bolo. Se toman muestras de sangre a los 2, 4, 6, 10, 20, y 30 minutos después de la infusión en bolo de glucosa.

Tabla 3

Vehículo:	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Promedio	SEM
<i>ABC de Insulina (ng*min/ml)</i>							
<b>0-2</b>	11	9,4	7	11	9,6		
<b>2-4</b>	18,1	9,7	5,6	10,6	8,8		
<b>4-6</b>	13,4	7	3,4	9,6	5,9		
<b>6-10</b>	7,9	3,5	2,5	6	2,9		
<b>10-20</b>	3,7	3	2,4	3	2,4		
<b>20-30</b>	2	0	0	0	2,4		
<b>suma</b>	56,1	32,6	20,9	40,2	32	36,4	5,8

Tabla 4

GLP-1-Fc	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Promedio	SEM
(1,79 mg/kg)							
<i>ABC de Insulina (ng*min/ml)</i>							
<b>0-2</b>	12,3	17,4	16	14	13		
<b>2-4</b>	21,9	13,3	13,2	13,9	13,6		
<b>4-6</b>	16,8	6,5	9,8	11,1	11,7		
<b>6-10</b>	7,6	3,8	9,2	5,8	7,4		
<b>10-20</b>		0	0	3,2	5,6		

(continuación)

GLP-1-Fc	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5		
(1,79 mg/kg)							
<b>20-30</b>	0	0	0	0	0		
<b>suma</b>	61,6	41	48,2	48	51,3	50	3,4

Tabla 5

GLP-1-Fc	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4		
(0,179 mg/kg)						
<i>ABC de Insulina (ng*min/ml)</i>					<b>Promedio</b>	<b>SEM</b>
<b>0-2</b>	14,4	29,2	25,4	23,2		
<b>2-4</b>	13,8	26,3	21,2	21,8		
<b>4-6</b>	11,2	19,4	16,4	15,7		
<b>6-10</b>	6,4	10,6	10,5	8		
<b>10-20</b>	3,6	5,8	5,2	5		
<b>20-30</b>	0	0	0	0		
<b>suma</b>	49,4	91,3	78,7	73,7	78,7	8,7

#### 5 Ejemplo 4 Estudio farmacocinético después de una inyección subcutánea única a monos cinomolgos.

Se realiza un estudio para caracterizar la farmacocinética (PK) de la proteína de fusión con Fc, Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A), cuando se administra como una inyección de 0,1 mg/kg por vía subcutánea (SC) a monos cinomolgos machos. El anticuerpo de RIA es específico para la porción media de GLP. El ELISA utiliza un anticuerpo de captura específico para el N-terminal y un anticuerpo de detección específico para Fc. Las concentraciones plasmáticas resultantes de ELISA y RIA se usan para determinar los valores de los parámetros farmacocinéticos representados.

Una representación de los valores de los parámetros PK resultantes se resume en la tabla 6. La PK de la dosis única SC del RIA se asocia con una C<sub>máx</sub> media de 446,7 ng/ml, con un T<sub>máx</sub> correspondiente de 17,3 horas. El promedio de la semivida de eliminación es de aproximadamente 79,3 horas (3,3 días). La PK del ELISA se asocia con una C<sub>máx</sub> media de 292,2 ng/ml con un T<sub>máx</sub> correspondiente de 16,7 horas. El promedio de la semivida de eliminación es de aproximadamente 51,6 horas (2,2 días).

Tabla 6

RIA							
Dosis	Animal #	C <sub>máx</sub> <sup>a</sup>	T <sub>máx</sub> <sup>b</sup>	AUC <sub>0-∞</sub> <sup>c</sup>	t <sub>1/2</sub> <sup>d</sup>	CL/F <sup>e</sup>	Vss/F <sup>f</sup>
(mg/kg)		(ng/ml)	(h)	(ng*h/ml)	(h)	(ml/h/kg)	(ml/kg)
0,1	96051	461,0	4,0	37770,5	81,0	2,7	309,2
	96071	430,0	24,0	43150,2	74,2	2,3	248,1
	96091	449,0	24,0	62271,1	82,9	1,6	191,9
RIA	Media	446,7	17,3	47730,6	79,3	2,2	249,8
	SD	15,6	11,5	12876,5	4,5	0,5	58,7



(continuación)

ELISA							
	96051	315,4	2,0	9062,3	55,2	11,0	879,4
	96071	289,4	24,0	16653,0	50,3	6,0	436,0
	96091	271,9	24,0	19907,4	49,3	5,0	357,0
ELISA	Media	292,2	16,7	15207,6	51,6	7,3	557,5
	SD	21,9	12,7	5565,2	3,2	3,2	281,6
Concentración plasmática máxima observada.							
<sup>b</sup> Tiempo a la concentración plasmática máxima observada.							
<sup>c</sup> Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo medida de 0 a infinito.							
<sup>d</sup> Semivida de eliminación.							
<sup>e</sup> Aclaramiento corporal total como una función de la biodisponibilidad.							
<sup>f</sup> Volumen de distribución como una función de la biodisponibilidad.							
SD = Desviación estándar.							

**Ejemplo 5 Evaluación de la formación potencial de anticuerpos después de inyecciones subcutáneas repetidas.**

- 5 Se examinan muestras de suero designadas de monos cinomolgos en cuanto a la formación de anticuerpos contra Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) utilizando un formato de ELISA directo. Se revisten microplacas de titulación con Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-L-IgG4 (S228P, F234A, L235A) a una concentración de 0,1 ug/ml. Las muestras de suero de mono se diluyen 50, 500, 1000 y 5000 veces en solución de bloqueo, y 0,05 ml de muestra/pocillo se incuban aproximadamente una hora. El anticuerpo secundario, Cabra <Fab'2 humano>-Peroxidasa (con 75% de reactividad cruzada a humano), se diluye 10.000 veces en bloque y se añade a 0,05 ml/pocillo y se incuba aproximadamente una hora. El desarrollo de color utilizando sustrato de tetrametilbencidina (TMB) se lee a una densidad óptica de 450 nm - 630 nm. Las lecturas por duplicado se promedian. Se utiliza un anticuerpo anti-GLP-1 como control positivo y el conjugado cabra<conejo>(H+L)-Peroxidasa es el anticuerpo secundario usado para la detección. Se recolectan muestras de suero puntuales antes de la administración de la dosis, a las 24 horas después de la segunda dosis, y 168 horas después de la dosis primera y segunda dosis SC para una evaluación de la inmunogenicidad potencial. La presencia de títulos de anticuerpos a G8E22-CEX-L-hIgG4 es interpretada por comparación con muestras de suero predosis y un control positivo. Una representación de los resultados se presenta en la tabla 7.

Tabla 7

Dosis 1 Animal#	Control positivo	IO7774		IO7777		IO7779		IO7780	
Tempo de la muestra:		Predosis	168 h	Predosis	168 h	Predosis	168 h	Predosis	168 h
50x	2,854	0,268	0,268	0,160	0,128	0,144	0,152	0,264	0,224
500x	2,270	0,117	0,133	0,052	0,069	0,065	0,061	0,067	0,061
1000x	1,610	0,091	0,075	0,034	0,051	0,047	0,045	0,138	0,049
5000x	0,525	0,056	0,048	0,032	0,037	0,029	0,033	0,051	0,039

20

(continuación)

Dosis 2 Animal#	Control positivo	IO7774		IO7777		IO7779		IO7780	
Tempo de la muestra:		Predosis	24 h	Predosis	24 h	Predosis	24 h	Predosis	24 h
50x	3,056	0,298	0,231	0,164	0,159	0,227	0,176	0,211	0,192
500x	2,247	0,120	0,119	0,048	0,045	0,061	0,060	0,056	0,057
1000x	1,673	0,090	0,086	0,039	0,041	0,046	0,045	0,043	0,048
5000x	0,534	0,039	0,042	0,030	0,034	0,033	0,036	0,033	0,034
Dosis 2 Animal#	Control positivo	IO7774		IO7777		IO7779		IO7780	
Tempo de la muestra:		Predosis	168 h	Predosis	168 h	Predosis	168 h	Predosis	168 h
50x	3,075	0,413	0,270	0,174	0,182	0,185	0,190	0,224	0,191
500x	2,173	0,097	0,103	0,042	0,051	0,056	0,057	0,048	0,053
1000x	1,510	0,066	0,067	0,038	0,040	0,037	0,046	0,043	0,043
5000x	0,474	0,042	0,042	0,033	0,046	0,033	0,033	0,036	0,041

**Ejemplo 6 Estudio farmacodinámico después de una inyección única por vía subcutánea a monos cinomolgos en estado de ayuno y durante la administración intravenosa de glucosa escalonada.**

5 Infusión

En la Fase 1 (Día 1 del Estudio) se administra una inyección subcutánea de vehículo. Se administra a continuación una infusión de glucosa (dextrosa 20%) intravenosa escalonada de 5, 10 y 25 mg/kg/min inmediatamente después de la inyección del vehículo. En la Fase 2 (Día 3 del Estudio), se administra una inyección subcutánea de proteína de fusión GLP-1 (0,1 mg/kg). En la Fase 3, se realiza una infusión intravenosa de glucosa escalonada aproximadamente 96 horas después de la inyección de fusión GLP-1.

10 Los procedimientos de la infusión intravenosa de glucosa escalonada se llevan a cabo en monos sedados después de un ayuno de 16 horas durante la noche. Para ambas infusiones de glucosa por vía intravenosa, se extraerán muestras basales cada 10 minutos durante 20 minutos con el fin de definir el valor inicial. Se inicia una infusión de glucosa escalonada a +20 minutos a una tasa de 5 mg/kg/min, seguida por infusiones de 10 mg/kg/min, y 25 mg/kg/min. Cada tasa de infusión se administra por un período de 20 minutos. Se toman muestras de sangre a intervalos de 10 minutos para la medición de glucosa, insulina y glucagón. Se recolectan aproximadamente 1,0 ml de sangre a -20, -10, 0 min previos a las infusiones de glucosa, y a 10, 20, 30, 40, 50, y 60 minutos después de la infusión de glucosa para las Fases 1 y 3.

Una representación de los datos se muestra en la tabla 8.

20

Tabla 8

ABC de Glucosa					
Grupo	Animal	ABC	Grupo	Animal	ABC
		(min*mg/dl)			(min*mg/dl)
GLP-Fc	9423	7447	Vehículo	9423	8077
	9424	7470		9424	15006

(continuación)

<b>ABC de Glucosa</b>					
Grupo	Animal	ABC (min*mg/dl)	Grupo	Animal	ABC (min*mg/dl)
	9510	5153		9510	7116
	9513	6303		9513	7459
	9516	5413		9516	8728
	9530	5240		9530	7863
				N	6
	Media	6171		Media	9041
	SD	1078		SD	2973
	SE	440		SE	1214
<b>ABC de Insulina</b>					
Grupo	Animal	ABC (min*mg/dl)	Grupo	Animal	ABC (min*mg/dl)
GLP-Fc	9423	129	Vehículo	9423	38
	9424	138		9424	29
	9510	357		9510	69
	9513	161		9513	64
	9516	376		9516	38
	9530	215		9530	68
	Media	229		Media	51
	SD	111		SD	18
	SE	45		SE	7

Los niveles de glucagón no fueron estadísticamente diferentes entre los monos tratados con vehículo y con proteína de fusión GLP-1.

5 **Ejemplo 7 Estudio farmacodinámico después de inyecciones únicas por vía subcutánea de tres dosis diferentes a ratas en estado de ayuno y durante una infusión intravenosa de glucosa escalonada.**

10 Se asignaron ratas canuladas crónicamente a control de vehículo (solución salina) o uno de tres grupos de tratamiento (proteína de fusión GLP-1; 0,0179 mg/kg, 0,179 mg/kg o 1,79 mg/kg). La proteína de fusión GLP-1 y el vehículo se administran mediante inyección subcutánea. Veinticuatro horas después del tratamiento, las ratas en ayuno durante una noche (16 h) son sometidas a una prueba de infusión intravenosa de glucosa escalonada. La prueba de infusión de glucosa escalonada consiste en un periodo basal con infusión de solución salina (20 min), seguido por dos fases de 30 minutos de infusión de glucosa a 5 y 15 mg/kg/min, respectivamente. Se recolectan muestras de plasma a -20, -10, 0 min previos a las infusiones de glucosa (basal), y a 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos.

Una representación de los datos se muestra en la tabla 9.

Tabla 9

	5 mg/kg/min	15 mg/kg/min
Vehículo	4,3 ± 0,2 (n=18)	12,7 ± 0,9 (n=18)
0.0179 mg/kg	5,6 ± 0,4 (n=4)	15,9 ± 1,8 (n=4)
0.179 mg/kg	9,0 ± 1,1 * (n=6)	28,0 ± 3,8* (n=6)
1.79 mg/kg	20,5 ± 3,0 * (n=4)	52,7 ± 7,2* (n=4)

\*P ≤ 0,05 versus vehículo

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

5 <120> Proteínas de fusión análogas de GLP-1

<130> X-15984

<150> 60/477880

<151> 2003-06-12

<160> 21

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

<222> (2)..C2)

20 <223> xaa en la posición 2 es Gly o Val

<400> 1

```

His xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1          5          10          15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly
          20          25          30
    
```

<210> 2

<211> 31

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly o Val

5 <400> 2

```

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1          5          10          15
-
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly
          20          25          30
    
```

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

15 <222> (2)..C2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly o Val

<400> 3

```

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1          5          10          15
-
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Pro
          20          25          30
    
```

<210> 4

20 <211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

<222> (2)..(2)

<223> xaa en la posición 2 es Gly o Val

<400> 4

ES 2 371 072 T3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
1 5 10 15  
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro  
20 25 30

<210> 5

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly o Val

<400> 5

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
1 5 10 15  
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly  
15 20 25 30

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

25 <222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly o Val

<400> 6

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
1 5 10 15  
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Lys Asn Gly Gly  
20 25 30

- <210> 7  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Artificial
- 5 <220>  
 <223> Constructo sintético  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS  
 <222> (16)..(16)
- 10 <223> Xaa en la posición 16 es Pro o Glu  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS  
 <222> (17)..(17)
- <223> Xaa en la posición 17 es Phe, Val, o Ala
- 15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS  
 <222> (18)..(18)
- <223> Xaa en la posición 18 es Leu, Glu, o Ala  
 <220>
- 20 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS  
 <222> (80)..(80)
- <223> Xaa en la posición 80 es Asn o Ala  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
- 25 <222> (230)..(230)
- <223> Xaa en la posición 230 es Lys o está ausente  
 <400> 7

Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 20 25 30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 35 40 45

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 50 55 60

ES 2 371 072 T3

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Xaa  
 65 70 75 80  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 85 90 95  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 100 105 110  
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 115 120 125  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 130 135 140  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 145 150 155 160  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 165 170 175  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
 180 185 190  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 195 200 205  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 210 215 220  
 Ser Leu Ser Leu Gly Xaa  
 225 230

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

10 <210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9



ES 2 371 072 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15  
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
20 25 30

<210> 10

<211> 71

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 10

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
1 5 10 15  
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Gly  
20 25 30  
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
35 40 45  
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser  
50 55 60  
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
65 70

10 <210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Constructo sintético

<400> 11

Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Gly Gly  
1 5

<210> 12

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 12

ES 2 371 072 T3

Trp Leu val Lys Gly Gly Gly  
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 13

Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly  
1 5

10 <210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Constructo sintético

<400> 14

Trp Leu val Lys Gly Gly Pro  
1 5

<210> 15

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 15

Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro  
1 5

25

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 16

ES 2 371 072 T3

Trp Leu val Lys Gly Gly  
1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 17

Trp Leu Lys Asn Gly Gly  
1 5

10 <210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Pro Pro Cys Pro Ser Cys  
1 5

15

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 19

Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly  
1 5 10 15

ser Gly Gly Gly Gly ser  
20

<210> 20

25 <211> 825

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

cacggcgagg gcaccttcac ctccgacgtg tcctcctatc tcgaggagca ggccgccaag 60

ES 2 371 072 T3

```

gaattcatcg cctggctggt gaagggcggc ggcggtggtg gtggctccgg aggcggcggc 120
tctggtggcg gtggcagcgc tgagtccaaa tatggtcccc catgcccacc ctgcccagca 180
cctgaggccg ccgggggacc atcagtcttc ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc 240
atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc 300
gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 360
cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 420
gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc 480
atcgagaaaa ccctctcaa agccaaaggg cagccccgag agccacaggt gtacaccctg 540
ccccatccc aggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 600
ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg gaaagcaatg ggcagccgga gaacaactac 660
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caggctaacc 720
gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 780
ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc tcctgtctc tgggt 825

```

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 21

```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1           5           10          15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20          25          30

```

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína de fusión heteróloga que comprende un análogo de GLP-1 que comprende una secuencia seleccionada de:

a)

**(SEQ ID NO:1)**

**His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-Gly**

5

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

b)

**(SEQ ID NO:2)**

**His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Gly**

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

10 c)

**(SEQ ID NO:3)**

**His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-Pro**

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

d)

**(SEQ ID NO:4)**

**His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro**

15 en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

e)

**(SEQ ID NO:5)**

**His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly**

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

f)

**(SEQ ID NO:6)**

**His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly**

20

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly y Val;

fusionada a la porción Fc de una inmunoglobulina que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7

Ala-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-

Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-  
 Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-  
 Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-  
 Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-  
 Glu-Glu-Gln-Phe-Xaa<sub>80</sub>-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-  
 Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-  
 Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-  
 Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-  
 Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-  
 Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-  
 Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-  
 Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-  
 Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-  
 Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-  
 Leu-Ser-Leu-Gly-Xaa<sub>230</sub> (SEQ ID NO:7)

en la que:

Xaa en la posición 16 es Pro o Glu;

5 Xaa en la posición 17 es Phe, Val o Ala;

Xaa en la posición 18 es Leu, Glu, o Ala;

Xaa en la posición 80 es Asn o Ala; y

Xaa en la posición 230 es Lys o está ausente.

10 2. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 1 en la que el residuo de glicina C-terminal del análogo de GLP-1 está fusionado al residuo de alanina N-terminal de la porción Fc a través de un conector péptido que comprende una secuencia seleccionada de:

a) Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:8);

**b) Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:19); y**

**c) Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:21).**

15 3. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 2 en la que el conector comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8.

4. La proteína de fusión heteróloga de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que Xaa en la posición 8 del análogo de GLP-1 es Gly.

5. La proteína de fusión heteróloga de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que Xaa en la posición 8 del análogo de GLP-1 es Val.

20 6. La proteína de fusión heteróloga de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el análogo de GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

7. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 1 en la que la proteína de fusión heteróloga se selecciona de:  
 a) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P); b) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A);  
 c) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, N297A); d) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A,  
 5 L235A, N297A); e) Gly-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P); f) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1 (7-37)-1.5L-IgG4  
 (S228P, F234A, L235A); g) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, N297A); h) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-  
 37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); i) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P); j) Gly-Glu<sup>22</sup>-  
 Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A); k) Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)- 2L-IgG4 (S228P, N297A); l)  
 Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-Gly<sup>36</sup>-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); y las formas des-K de los mismos.

8. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 7 en la que la proteína de fusión es la forma des-K de Gly<sup>8</sup>-  
 10 Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A).

9. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 1 en la que la proteína de fusión heteróloga se selecciona de:  
 a) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P); b) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A, L235A);  
 c) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, N297A); d) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1L-IgG4 (S228P, F234A,  
 15 L235A, N297A); e) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P); f) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1 (7-37)-1.5L-IgG4  
 (S228P, F234A, L235A); g) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-1.5L-IgG4 (S228P, N297A); h) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-  
 37)-1.5L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); i) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P); j) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-  
 GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A); k) Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1 (7-37)-2L-IgG4 (S228P, N297A); l)  
 Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Gly<sup>36</sup>-GLP-1(7-37)-2L-IgG4 (S228P, F234A, L235A, N297A); y las formas des-K de los mismos.

10. La proteína de fusión heteróloga de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:  
 20 (a) un análogo de GLP-1 que comprende la SEQ ID NO: 1 His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-  
 Tyr-Leu- Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-GLy

en la que Xaa<sub>8</sub> se selecciona de Gly;

(b) una porción Fc de una inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO: 7

**Ala-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-  
 Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-  
 Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-  
 Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-  
 Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-  
 Glu-Glu-Gln-Phe-Xaa<sub>80</sub>-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Lcu-Thr-  
 Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-  
 Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-  
 Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-  
 Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-  
 Lcu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-  
 Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-  
 Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-  
 Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-  
 Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-  
 Lcu-Ser-Lcu-Gly-Xaa<sub>230</sub>**

25 en la que:

Xaa en la posición 16 es Glu;

Xaa en la posición 17 es Ala;

Xaa en la posición 18 es Ala;

Xaa en la posición 80 es Asn; y

30 Xaa en la posición 230 está ausente; y

(c) un conector péptido que comprende la SEQ ID NO: 8

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser,

en el que la glicina N-terminal del conector péptido está fusionada directamente con el residuo de glicina C-terminal del análogo de GLP-1 y la serina C-terminal del conector péptido está fusionada directamente a la alanina N-terminal de la porción Fc.

5 11. La proteína de fusión heteróloga de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende la secuencia de aminoácidos:

**HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPP  
CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
SLG.**

- 10 12. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 11.
13. La secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 12, en la que dicha secuencia comprende la SEQ ID NO: 20.
14. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como un medicamento.
- 15 15. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus no dependiente de insulina.
16. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento de la obesidad o la inducción de pérdida de peso en un individuo con sobrepeso.
17. Un dímero que comprende dos proteínas de fusión heterólogas de acuerdo con la reivindicación 11.
- 20 18. Una formulación que comprende una cualquiera de las proteínas de fusión heterólogas de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11.
19. Una formulación que comprende el dímero de acuerdo con la reivindicación 17.