

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 218**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/605** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2006 E 06792228 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **04.06.2008 EP 1926748**

54 Título: **Polipéptidos de fusión de GLP-1 (péptido 1 de tipo glucagón) con resistencia a la peptidasa aumentada**

30 Prioridad:

**22.09.2005 EP 05020718**

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

**23.01.2013**

73 Titular/es:

**BIOCOMPATIBLES UK LIMITED (100.0%)  
CHAPMAN HOUSE, FARNHAM BUSINESS PARK,  
WEYDON LANE  
FARNHAM SURREY GU9 8QL, GB**

72 Inventor/es:

**GEIGLE, PETER;  
WALLRAPP, CHRISTINE y  
THOENES, ERIC**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 394 218 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de fusión de GLP-1 (péptido 1 de tipo glucagón) con resistencia a la peptidasa aumentada.

La presente invención se refiere nuevos péptidos de fusión de GLP-1, que tienen un C-terminal extendido, son resistentes a la inactivación por endopeptidasa IV, pueden expresarse a altos niveles en células animales transformadas, y son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

El gen del glucagón está bien estudiado, véase, por ejemplo, White, J.W., et al., 1986, Nucleic Acid Res., 14(12):4719-4730. La molécula de preproglucagón, como molécula precursora de alto peso molecular, es sintetizada en células alfa pancreáticas y en las células L del yeyuno y del colon. El preproglucagón es una prohormona con una longitud de 180 aminoácidos y su secuencia contiene, además del glucagón, dos secuencias de estructura relacionada: el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y el péptido 2 similar al glucagón (GLP-2). En la molécula de preproglucagón, entre GLP-1 y GLP-2 existe una secuencia peptídica de 17 aminoácidos (o más bien una secuencia de 15 aminoácidos más el sitio de ruptura RR C-terminal), el péptido intermedio 2 (IP-2). La secuencia de IP-2 (localizada entre GLP-1 y -2 en la molécula precursora) normalmente se rompe de modo *proteolítico* después del aa 37 de GLP-1. Por tanto, el módulo de preproglucagón se rompe en varios péptidos, dependiendo de la célula y del entorno, que incluyen GLP-1(1-37), un péptido de 37 aminoácidos en su forma no procesada. En general, este procesamiento se produce en el páncreas y en el intestino. La secuencia de GLP-1(1-37) después puede ser procesada de modo proteolítico para producir GLP-1(7-37) activo, la forma procesada de 31 aminoácidos, o GLP-1(7-36)amida. Por consiguiente, la denominación GLP-1(7-37) se refiere al fragmento en cuestión que comprende los restos aminoácidos desde el número 7 (inclusive) hasta el número 37 (inclusive) cuando se cuenta desde el extremo N-terminal del péptido de origen, GLP-1. La secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-36)amida y de GLP-1(7-37) aparece en la fórmula I (SEQ ID NO:43):

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-X (I), que muestra GLP-1(7-36)amida, en la que X es NH<sub>2</sub>, y GLP-1(7-37), en la que X es Gly-OH.

El GLP-1 es una hormona intestinal y es el agente insulínico endógeno más potente con acciones que incluyen la estimulación de la actividad adenilato ciclasa y proteína quinasa en las células beta. Desde el punto de vista fisiológico, junto con el polipéptido inhibidor gástrico del intestino superior, actúa como hormona incretina que disminuye el nivel sanguíneo de glucosa. Por consiguiente, GLP-1, que se segrega en respuesta al consumo de alimentos, tiene múltiples efectos, por ejemplo, en el estómago, hígado, páncreas y cerebro, que actúan en concierto para regular el azúcar sanguíneo. Por consiguiente, el péptido similar al glucagón GLP-1(7-36)amida, y su análogo no amidado GLP-1(7-37), han atraído un interés considerable debido a sus potentes acciones sobre el metabolismo de carbohidratos y su potencial aplicación al tratamiento de la diabetes, incluyendo la diabetes de tipo 2. La diabetes de tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina, puesto que las células no responden de forma apropiada cuando la insulina está presente. Este es un problema más complejo que la diabetes de tipo 1. La diabetes de tipo 2 puede pasar desapercibida durante años en un paciente antes del diagnóstico, puesto que los síntomas generalmente son más suaves (no hay cetoacidosis) y pueden ser esporádicos. Sin embargo, pueden producirse graves complicaciones como resultado de una diabetes de tipo 2 no detectada, incluyendo insuficiencia renal y enfermedad cardíaca coronaria. Esto conduce a una mayor morbilidad y mortalidad.

La GLP-1(7-36)amida o el GLP-1(7-37) tienen una corta vida en suero. La dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) rompe el péptido entre los restos 8 y 9. El péptido roto es inactivo. Por tanto, el GLP-1 administrado de modo exógeno tiene una vida extremadamente corta y tiene una utilidad limitada para aplicaciones terapéuticas.

Se han realizado diversos intentos para sintetizar análogos estabilizados (frente a DPP-IV) de GLP-1 natural (GLP-1(7-37)). En particular, el resto 8, que *in vivo* es Ala, ha sido reemplazado por otro resto, por ejemplo, Gly, Ser o Thr (Burcelin, R., et al. (1999), Metabolism, 48, 252-258). El análogo de Gly8 o G8 se ha ensayado a fondo, tanto como molécula sintetizada como producida por líneas celulares modificadas genéticamente para que segreguen el polipéptido mutante (Burcelin, R., et al. (1999), Annals of the New York Academy of Sciences, 875:277-285). Se han introducido diversas otras modificaciones en GLP-1(7-37) para potenciar su estabilidad *in vivo* sin comprometer su actividad biológica. Sin embargo, todas estas estrategias no han logrado ninguna importancia terapéutica significativa debido a los considerables problemas implicados.

El documento WO 02/46227 describe proteínas de fusión de GLP-1 que comprenden compuestos similares al glucagón-1 condensados con proteínas adecuadas para extender la semivida *in vivo* de los péptidos. En particular, el documento WO 02/46227 describe una proteína de fusión de GLP-1 con albúmina o inmunoglobulina. Según el documento WO 02/46227, estas proteínas pueden utilizarse para tratar la diabetes mellitus no insulínica, así como una diversidad de otros trastornos. Sin embargo, el documento WO 02/46227 no describe proteínas de fusión que comprenden, como componente (I) GLP-1(7-35, 7-36 o 7-37) en el N-terminal o cualquiera de sus derivados, y como componente (II) una secuencia peptídica que contiene una secuencia según SEQ ID NO:26 (AADFP EEVAI) en el C-terminal.

De forma similar, el documento US 2003/0221201 describe proteínas de fusión de transferrina y GLP-1. De manera similar, el documento US 2003/0195154 describe una proteína de fusión de GLP-1 y transtiretina como compañeros

de fusión. Sin embargo, no se describen ni se sugieren otras proteínas de fusión de GLP-1 en los documentos US 2003/0221201 o US 2003/0195154, en particular ningún otro compañero de fusión posible para GLP-1 capaz de estabilizar a GLP-1 *in vivo*.

5 El documento 99/46283 describe un conjugado de péptido farmacológicamente activo que comprende una secuencia peptídica farmacológicamente activa (X), como GLP-1, y una secuencia peptídica estabilizante (Z) de 4 a 20 restos aminoácidos, que está unida covalentemente a la secuencia peptídica farmacológicamente activa (X). La secuencia peptídica estabilizante (Z) puede ser, por ejemplo, secuencias  $Lys_p-Xaa_q$  o  $Xaa_p-Lys_q$ , en las que p y q son números enteros en el intervalo de 1 a 14, con la condición de que p+q esté en el intervalo de 3-15, y cada Xaa se selecciona independientemente del grupo que consiste en Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Arg, His, Orn, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropanoico y Met, en particular secuencias peptídicas cortas de fórmula  $Lys_3-Glu_3$ , o  $Glu_3-Lys_3$ . El documento WO 99/46283 no describe proteínas de fusión que comprenden, como componente (I) GLP-1(7-35, 7-36 o 7-37) en el N-terminal o cualquiera de sus derivados, y como componente (II) una secuencia peptídica que contiene una secuencia según SEQ ID NO:26 (AADFPPEEVAI) en el C-terminal.

10 El documento WO 03/058203 describe un péptido de GLP-1 acoplado con un C-terminal extendido que proporciona mayor estabilidad. Este C-terminal extendido comprende al menos 6 aminoácidos, preferiblemente de 7 a 9 aminoácidos. El documento WO 03/058203 no describe proteínas de fusión de GLP-1 que comprenden una secuencia según SEQ ID NO:26 (AADFPPEEVAI) como C-terminal extendido.

15 El documento US 2004/0146985 describe una proteína de fusión de GLP-1(7-37) que contiene múltiples copias del péptido de GLP-1(7-37) para producir este agente terapéutico a gran escala. El documento US 2004/0146985 no describe una proteína de fusión de GLP-1(7-37) que comprende, como componente (I) GLP-1(7-35, 7-36 o 7-37) en el N-terminal o cualquiera de sus derivados, y como componente (II) una secuencia peptídica que contiene una secuencia según SEQ ID NO:26 (AADFPPEEVAI) en el C-terminal.

20 El documento US 5.861.284 describe péptidos de fusión de GLP-1(7-37) y una secuencia de aminoácidos derivada del factor de crecimiento de fibroblastos en el C-terminal. La invención del documento US 5.861.284 se refiere en particular a la producción de péptidos sin cisteína, producidos mediante una proteína de fusión que comprende una proteína que tiene cisteína en su extremo N-terminal, y un péptido sin cisteína acoplado al extremo N-terminal, y que posteriormente se escinde el péptido sin cisteína. El documento US 5.861.284 no describe péptidos de fusión de GLP-1(7-37) ni una secuencia peptídica que contiene una secuencia según SEQ ID NO:26 (AADFPPEEVAI).

25 Un artículo de Kieffer et al. (Endocrine Reviews (1999), vol. 20, nº 6, pp. 876-913) y un artículo de Drucker et al. (Mol. Endocrinol. (2003), vol. 17, nº 2, pp. 161-171) describen la secuencia de aminoácidos del proglucagón, en la que en este péptido natural están condensados el péptido de GLP-1, IP-2 y el péptido de GLP-2. En estos artículos no se describen péptidos de fusión de GLP-1(7,37, 7,36 o 7-35).

30 Además, un artículo de Perry et al. (Current Alzheimer's Research, 2005, 2, 377-385) se refiere a la relación entre la vía del receptor de GLP y la enfermedad de Alzheimer. En Perry et al. (2005) no se describen péptidos de fusión de GLP-1 según la presente invención.

35 El documento WO 98/08871 describe diversos derivados de GLP-1, en particular un derivado de GLP-1, en el que al menos un aminoácido de GLP-1 tiene un sustituyente lipófilo unido. Sin embargo, el documento WO 98/08871 no describe péptidos de fusión de GLP-1 de GLP-1(7,37, 7,36 o 7-35) ni una extensión peptídica del C-terminal de GLP-1.

40 El documento WO 2005/058958 se refiere a análogos de GLP-1 unidos a agentes similares a la albúmina. El documento EP 1.454.629 describe un péptido parcial de un péptido de preproglucagón que comprende al menos la secuencia de aminoácidos en las posiciones 92-97 de un péptido de preproglucagón como ingrediente eficaz de un fármaco antidiabético. El documento US 6.858.576 se refiere a métodos para regular la motilidad gastrointestinal, en particular al uso de exendinas y sus análogos y agonistas. Sin embargo, ninguno de estos documentos describe un péptido de fusión que consiste en un fragmento de GLP-1/GLP-2 N-terminal y una secuencia C-terminal que otorga una mayor resistencia frente a la inactivación por DPP-IV y que tenga una coincidencia de al menos 90% con la secuencia AADFPPEEVAI.

45 De modo similar, el documento WO 2006/010143 describe un péptido de fusión de GLP-1/GLP-2 que comprende GLP-1(7-37) en el N-terminal. Además, contiene un fragmento de IP-2. Sin embargo, D15 no describe un péptido de fusión que comprende, como primer componente, una secuencia en el N-terminal según la fórmula II o la fórmula III según se define a continuación, y como segundo componente, una secuencia peptídica en el C-terminal que tiene al menos 9 aminoácidos que contiene una secuencia según la secuencia AADFPPEEVAI o que tenga una coincidencia de al menos 90% con esta secuencia.

50 En el documento WO/9953064, Thorens, B. describe una estrategia para crear un módulo de expresión de GLP-1 multimérico que puede incorporarse en una diversidad de tipos celulares, que son líneas celulares inmortalizadas y cultivos de células primarias en división disponibles para el público. Los ejemplos incluyen neuroesferas que responden a EGF, células precursoras progenitoras neurales que responden a bFGF del SNC de mamíferos,

mientras que el ejemplo de trabajo utiliza células BHK, de riñón de cría de hámster. Se dice que las células transfectadas implantadas han sido utilizadas para tratar con éxito a ratones diabéticos, lo que permite un control de la glucosa sustancialmente igual a los controles no diabéticos. Sin embargo, estas técnicas no se ajustan a los requerimientos de un tratamiento que se vaya a administrar habitualmente a pacientes diabéticos.

5 Otra estrategia para estabilizar el nivel de glucosa de modo exógeno se basa en una nueva clase de medicinas conocidas como miméticos de incretina que está investigándose para el tratamiento de la diabetes de tipo 2. La exenatida (Byetta®) es una versión sintética de un compuesto natural que se encuentra en la saliva del monstruo de Gila. En ensayos clínicos, un mimético de incretina (exenatida) ha demostrado producir unas reducciones en el azúcar sanguíneo y unas mejoras en marcadores de la función de las células beta. Sin embargo, la exenatida muestra sólo ciertos efectos de la hormona incretina péptido-1 similar al glucagón humana (GLP-1).

10 En resumen, en la actualidad no existe una terapia eficaz para la diabetes de tipo 2, que permita reducir el nivel de glucosa sanguínea basándose en GLP-1; en otras palabras, que proporcione una terapia que refleje el espectro completo de efectos beneficiosos conocidos para GLP-1, por ejemplo, su actividad en concentraciones fisiológicas para reducir poderosamente la velocidad de entrada de nutrientes hacia la circulación mediante la reducción de la velocidad de vaciado gástrico en sujetos obesos o su actividad estimuladora de insulina. Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar moléculas peptídicas basadas en GLP-1 que sean biológicamente activas y resistentes frente a la degradación proteolítica.

15 La presente invención se refiere a un péptido de fusión que comprende, como componente (I) una secuencia en el N-terminal según:

20 (i) la fórmula II

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

25 en la que Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, 3-hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico, en el que Gly es particularmente preferido; Xaa16 es Val o Leu; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa19 es Tyr o Gln; Xaa20 es Leu o Met; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa25 es Ala o Val; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa27 es Glu o Leu; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa33 es Val o Lys; Xaa34 es Lys, Glu, Asn o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg, Gly o Lys o amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente; o

30 (ii) la fórmula III

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa18-Tyr-Leu-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

35 en la que Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa34 es Lys, Glu o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg o Lys, amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu o Lys, amida o está ausente; o

40 (iii) GLP-1(7-37) de SEQ ID NO:1 o una secuencia funcional que ejerce los efectos biológicos de GLP-1 como hormona incretina, su acción antiapoptótica o sus propiedades neutróficas y que tiene una coincidencia de secuencia de al menos 80% con GLP-1(7-37);

45 y como componente (II) una secuencia peptídica en el C-terminal de al menos 9 aminoácidos, y que contiene una secuencia según SEQ ID NO:26 (AADFP EEVAI) o una secuencia que tiene una coincidencia de secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO:26, que otorga una mayor resistencia frente a la inactivación por DPP-IV del péptido de fusión; o

50 un péptido de fusión que comprende los componente (I) y (II) según se definió anteriormente, en el que al menos uno de los aminoácidos está derivatizado mediante una modificación del esqueleto peptídico, en el que la modificación del esqueleto peptídico produce un mimético de andamiaje, cuyo esqueleto es diferente del esqueleto natural, y cuyas cadenas laterales son idénticas al péptido de fusión no modificado; o

un péptido de fusión que comprende los componentes (I) y (II) según se definió anteriormente, en el que se proporciona un isómero retro-inverso del péptido de fusión.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un péptido de fusión según se describió anteriormente, en el que el componente (I) es GLP-1(7-35) o GLP-1(7-36).

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el péptido de la invención resultante está protegido frente a la degradación proteolítica *in vivo*, principalmente debida a la actividad proteolítica de la endopeptidasa IV. El péptido de la invención que tiene al menos dos componentes (I) y (II) según se definió anteriormente, muestra actividad biológica de GLP-1 y, simultáneamente, confiere estabilidad al GLP-1 como su componente (I) mediante un alargamiento C-terminal.

La expresión "péptido de la invención", tal como se emplea en la presente, es un péptido de fusión tal como se define en la presente, un variante, un análogo, un fragmento o cualquiera de sus derivados, incluyendo combinaciones, por ejemplo, un fragmento, análogo o variante derivatizado de un péptido de fusión. La expresión "péptido de GLP-1", tal como se emplea en la presente, significa cualquier análogo de GLP-1, derivado de GLP-1, variante de GLP-1 o fragmento de GLP-1, incluyendo un fragmento, análogo o variante derivatizado de GLP-1(7-35, 36 o 37), que puede aparecer en el componente (I) o en el componente (III) del péptido de la invención. La expresión "péptido de GLP-2", tal como se emplea en la presente, significa GLP-2(1-33, 34 o 35), mientras que un "péptido de GLP-2 modificado" pretende incluir cualquier análogo, fragmento o variante de GLP-2, un derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2, incluyendo un fragmento, análogo o variante derivatizado de GLP-2(1-33, 34 o 35). Los variantes, los análogos, los fragmentos y los derivados se clasifican como modificaciones de la secuencia no modificada, por ejemplo, GLP-1(7-35, 36 o 37) o GLP-2(1-33, 34 o 35). Dentro del significado de la presente invención, cualquier variante, análogo, fragmento o derivado debe ser funcional, por ejemplo, tiene que ejercer el mismo efecto biológico o efectos biológicos similares al del péptido de GLP-1 no modificado.

El péptido de la invención es un péptido de fusión, según se definió anteriormente, o cualquiera de sus variantes, análogos, fragmentos o derivados, en el que el componente (I) puede contener una secuencia que tiene al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, y aún más preferiblemente al menos 90% de coincidencia de secuencia con SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:1 representa la secuencia de aminoácidos nativa de GLP-1(7-37) (31 aminoácidos de longitud), que se conserva estrictamente entre los mamíferos.

El segundo componente (componente (II)), según se definió anteriormente, del péptido de fusión según la invención contiene una longitud de secuencia de al menos nueve aminoácidos, que pueden o no formar una estructura similar a una giro  $\beta$ . Una estructura de giro  $\beta$  es un elemento típico de la estructura secundaria de las proteínas o de los péptidos. Generalmente está formado por cuatro aminoácidos, que invierten la dirección de la cadena del esqueleto del péptido o de la proteína. La secuencia de aminoácidos del componente (II) contiene al menos nueve aminoácidos, y contiene al menos un resto prolina o alanina en su secuencia. Los restos prolina son aminoácidos habituales dentro de la secuencia de aminoácidos tetrámera que forma un giro  $\beta$ . El resto prolina de forma habitual se localiza generalmente en la posición 2 o 3, preferiblemente 2, de la secuencia de giro  $\beta$  tetrámera que aparece en el componente (II) del péptido de fusión.

Una fusión de la invención generalmente puede tener, en su componente (II), una longitud de secuencia de 9 a 30, preferiblemente de 9 a 20, y lo más preferiblemente de 9 a 15 aminoácidos. En términos generales, pueden preferirse unas secuencias más cortas en el componente (II) debido a su mejor actividad de unión al receptor de GLP frente a las secuencias más largas. La secuencia del componente (II), aunque no sea un prerrequisito, preferiblemente puede ser neutra o tener una carga negativa a pH 7.

Se prefiere un péptido de fusión según la invención si su componente (II) contiene un motivo de secuencia seleccionado del grupo que consiste en PEEV, DFPE, y AADX, en el que X representa cualquier aminoácido (un aminoácido natural o un aminoácido no natural modificado). Estos motivos tetrámeros pueden localizarse en cualquier posición en la secuencia del componente (II). En una realización particularmente preferida, el componente (II) del péptido de fusión de la invención es una secuencia peptídica unida al C-terminal del componente (I) a través de su motivo de secuencia N-terminal seleccionado del grupo que consiste en AA, XA, y AX, en el que X representa cualquier aminoácido (un aminoácido natural o un aminoácido no natural modificado).

Un motivo preferido del componente (II) en un péptido de fusión de la invención contiene el motivo de secuencia de SEQ ID NO:25 (DFPEEVA), o contiene una secuencia que tiene al menos 80% de homología de secuencia con el motivo de secuencia DFPEEVA, que se corresponde con una secuencia parcial de IP-2 humano o murino.

Tal como se definió anteriormente, en el péptido de fusión de la invención, el componente (II) es una secuencia peptídica que contiene una secuencia según SEQ ID NO:26 (AADFPEEVAI) (todas las secuencias peptídicas aparecen con el código de una letra), o una secuencia que tenga al menos 90% de coincidencia de secuencia con SEQ ID NO:26. SEQ ID NO:26 se deriva de una secuencia parcial de la secuencia de IP-2 (péptido intermedio-2) de longitud completa (humano o murino), que contiene los 10 aminoácidos N-terminales de la secuencia de IP-2 de longitud completa de 15 aminoácidos, mediante la sustitución de los restos N-terminales (RR) por (AA). El IP-2 es un ejemplo preferido de una secuencia peptídica que contiene un giro  $\beta$ . Por consiguiente, otras secuencias más preferidas que se incluirán en el componente (II) son secuencias de aminoácidos parciales de IP-2 más largas, tales como, por ejemplo, SEQ ID NO:27 (AADFPEEVAIVEEL), SEQ ID NO:28 (AADFPEEVAIAEEL), SEQ ID NO:29

(AADFP EEVAIVEELG), y SEQ ID NO:30 (AADFP EEVAIAEELG), en las que las secuencias mencionadas en este párrafo también pueden proporcionarse con el motivo N-terminal (AX) o (XA). Puede proporcionarse más de una copia de una secuencia que se incluirán en el componente (II), por ejemplo, 2, 3 o más copias de IP-2 o de un fragmento, un variante o un análogo o un derivado de IP-2.

5 Por consiguiente, se prefiere un péptido de fusión de la invención que contenga una secuencia según SEQ ID NO:31 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGAADFPEEVAIAEELG) o SEQ ID NO:38 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGAADFPEEVAIVEELG), es decir, GLP-1(7-37) unido sin ninguna secuencia conectora a través de su C-terminal a análogos o variantes específicos de la secuencia de IP-2.

10 Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, los inventores de la presente invención han concluido que la inestabilidad de GLP-1(7-35, 36 o 37), si se administra a cualquier paciente que lo necesite, es debida a su estructura tridimensional desprotegida. Las proteasas pueden romper el péptido de GLP-1(7-35, 36 o 37) y abolir su actividad fisiológica con rapidez *in vivo*. Mediante la unión de una secuencia peptídica al C-terminal de GLP-1(7-35, 36 o 37), su estructura gana estabilidad frente a la degradación enzimática. La ganancia en estabilidad parece potenciarse si la secuencia peptídica C-terminal adicional (contenida en el componente (II) del péptido de fusión según la invención) se pliega hacia atrás debido a la presencia de un elemento estructural de giro  $\beta$  formado por su estructura primaria y que proporciona rigidez al componente (II). Sin embargo, una estructura de giro  $\beta$  en el componente (II) del péptido de fusión de la invención no parece ser un prerrequisito para estabilizar la secuencia de GLP-1 del componente (I) frente a la degradación enzimática. Se ha descubierto que el péptido de fusión de la invención, en virtud a su extensión peptídica C-terminal, por ejemplo, que contiene un elemento estructural de giro  $\beta$ , tiene una mejor resistencia a la inactivación por DPP-IV. El péptido C-terminal no se escinde de la secuencia de GLP-1(7-35, 36 o 37) antes de actuar sobre su receptor en las células diana, o puede ser escindido de modo enzimático para formar GLP-1(7-35, 36 o 37) *in vivo*. Independientemente de la forma exacta del péptido de fusión de la invención unido al sitio del receptor de GLP-1, un péptido de fusión de la invención ejerce su función como compuesto insulínico activo.

25 Las secuencias peptídicas que son consideradas adecuadas para incluirse en el componente (II) debido a una estructura primaria que forma un elemento de giro  $\beta$  pueden ser identificadas con facilidad mediante métodos adecuados, por ejemplo, espectroscópicos, por ejemplo, dicróismo circular, u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

30 El componente (I) y el componente (II) pueden estar unidos directamente o pueden unirse a través de una secuencia conectora. Preferiblemente, ambos componentes están unidos directamente entre sí. En el caso en que estén unidos a través de un conector (o espaciador), el conector preferiblemente es un conector peptídico o un conector orgánico. Un conector peptídico generalmente tiene una longitud de 1 a 10 aminoácidos, preferiblemente de 1 a 5, aún más preferiblemente de 1 a 3 aminoácidos, y en algunos casos la secuencia conectora puede ser aún más larga, comprendiendo de 11 a 50 aminoácidos. Un conector peptídico puede estar compuesto de diversas secuencias de aminoácidos. Preferiblemente, un conector peptídico introducirá algo de flexibilidad estructural entre los componentes que se van a unir. La flexibilidad estructural se logra, por ejemplo, si el conector peptídico contiene diversos restos glicina o prolina, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, y aún más preferiblemente al menos 60% de restos prolina y glicina dentro de la secuencia conectora. Independientemente de la secuencia específica, el conector peptídico preferiblemente puede ser inmunológicamente inactivo.

40 En una realización preferida de la presente invención, un péptido de fusión de la invención contiene un tercer componente (componente (III)) que está unido al C-terminal del componente (II) y/o al N-terminal del componente (I). Preferiblemente, el componente (III) se localiza en el C-terminal del componente (II). Independientemente de que el componente (III) esté unido al N-terminal del componente (I) (por su C-terminal) o al C-terminal del componente (II) (por su N-terminal), el acoplamiento puede ser directo o indirecto a través de una secuencia conectora. Con respecto a la secuencia conectora, se hace referencia a la anterior descripción para un conector que conecte el componente (I) y el componente (II). En general, el componente (III) comprende al menos cuatro restos aminoácidos, preferiblemente al menos 10 restos aminoácidos adicionales, más preferiblemente al menos 20, o al menos 30. En términos funcionales, el componente (III) se proporciona para potenciar aún más la estabilidad del péptido de fusión de la invención. Se espera que el componente (III) no interfiera con la función biológica del péptido de fusión de la invención, que es aproximadamente comparable con la actividad biológica de GLP-1(7-37).

55 Preferiblemente, el componente (III) del péptido de fusión de la invención comprende al menos 4, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20 restos aminoácidos adicionales de la secuencia N-terminal de una isoforma de GLP-2 de cualquier organismo mamífero (otro variante natural de GLP-2 en mamíferos), por ejemplo, las isoformas murina o humana mostradas en SEQ ID NO:4 y 5. GLP-2 aparece en el proglucagón y también está implicado en el metabolismo de carbohidratos. Al igual que con la secuencia biológicamente activa incluida en el componente (I) (péptido de GLP-1), el componente (III) también puede comprender análogos, variantes o derivados de formas naturales de GLP-2. Como alternativa, el componente (III) también puede comprender al menos 4, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20 restos aminoácidos adicionales de la secuencia N-terminal de GLP-1(7-37), que como consecuencia incluye todas sus isoformas de mamífero o todos sus variantes funcionales, análogos o derivados (según se describen en la presente). En términos generales, el componente (III)

5 puede contener cualquier forma de un péptido de GLP-1 o un péptido de GLP-1 modificado, que se describa en la presente como adecuado para el componente (I) del péptido de fusión de la invención. En otra alternativa, el componente (III) también puede contener formas quiméricas de GLP-1(7-37) y GLP-2. Una forma quimérica puede producirse acoplando GLP-1(7-37) y GLP-2 (o los fragmentos, análogos, variantes o derivados de ambos) entre sí y después introduciendo esta forma quimérica como componente (III) en el péptido de fusión de la invención. Preferiblemente, la forma quimérica está compuesta de una secuencia parcial de GLP-1(7-37) y una secuencia parcial de GLP-2 unidas entre sí. Por ejemplo, la forma quimérica puede incluir de 5 a 30 aminoácidos del N-terminal de GLP-1, y de 5 a 30 aminoácidos del C-terminal de GLP-2, o viceversa, por ejemplo, los aminoácidos 7 u 8 a 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 de GLP-1(7-37), y la secuencia de aminoácidos de la posición 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 hasta, por ejemplo, el C-terminal de GLP-2.

10 Si se emplean modificaciones de formas naturales de GLP-2 o GLP-1(7-37), respectivamente, como componente (III), el componente (III) contendrá preferiblemente la secuencia de SEQ ID NO:4 o 5 o SEQ ID NO:1, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos 80% de coincidencia de secuencia con SEQ ID NO:4 o 5 o SEQ ID NO:1. Los derivados de estas secuencias preferidas, por ejemplo, debido a modificaciones de las cadenas laterales o modificaciones en el esqueleto peptídico, etc. (que, según se describe en la presente, pertenecen a "derivados"), también son incluidos como componente (III) por la presente invención.

15 En otra realización, el componente (III) puede contener una pluralidad de secuencias, según se describió anteriormente. Por ejemplo, el componente (III) puede contener al menos dos, preferiblemente 2, 3 o 4 copias de GLP-1(7-37) y/o GLP-2, o al menos dos copias de secuencias que tienen al menos 80% de coincidencia de secuencia con SEQ ID NO:1, 4 o 5. Además, el componente (III) puede contener más de una copia de una versión quimérica de GLP-1(7-37) o GLP-2, según se describió anteriormente, por ejemplo, que en último término forma una combinación de una versión o versiones quiméricas con GLP-1(7-37) y/o GLP-2 o sus modificaciones con al menos 80% de coincidencia de secuencia. Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen dos o más, preferiblemente dos componentes (III), que pueden estar unidos, por ejemplo, (1) a través de su N-terminal con el C-terminal del componente (II), y (2) a través de su C-terminal con el N-terminal del componente (I) a través de un conector o directamente. Si se proporcionan dos componentes (III), estos pueden ser iguales o diferentes.

20 Por consiguiente, los péptidos de fusión de la invención que contienen tres componentes (I), (II) y (III) son particularmente preferidos. Se seleccionan cuatro realizaciones específicas que contienen todos estos componentes de un grupo que consiste en: SEQ ID NO:6 (N-GLP-1(7-37)-IP-2(murino)-RR-GLP-1(7-37)-C, también denominado en la presente CM1 murino), SEQ ID NO:7(N-GLP-1(7-37)-IP-2(murino)-RR-GLP-2-C, también denominado en la presente CM2 murino), SEQ ID NO:10 (N-GLP-1(7-37)-IP-2(humano)-RR-GLP-1(7-37)-C, también denominado en la presente CM1 humano), y SEQ ID NO:11 (N-GLP-1(7-37)-IP-2(humano)-RR-GLP-2-C, también denominado en la presente CM2 humano), o una secuencia que tenga al menos 80% de coincidencia de secuencia con SEQ ID NO:6, 7, 10 u 11, o cualquiera de sus derivados. Todas las secuencias 6, 7, 10 y 11 contienen un conector-RR (dos restos arginina) en el C-terminal de IP-2 (componente (II)), que, como alternativa, también puede descartarse. El componente (I) en cada una de las realización según SEQ ID NO:6, 7, 10 o 11 es GLP-1(7-37), mientras que el componente (III) (en cada una de estas realizaciones está unido al C-terminal del componente (II)) es GLP-1(7-37) o GLP-2.

30 Los péptidos de fusión de la invención pueden aparecer en diversas formas modificadas. Estas formas modificadas se describen a continuación con más detalle.

35 El término "sales" en la presente se refiere a sales de grupos carboxilo y a sales de adición de ácidos de los grupos amino de los péptidos de fusión descritos anteriormente, o sus análogos, fragmentos, derivados o variantes. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica, e incluye sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y similares, y sales con bases orgánicas, como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como etanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácidos incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de estas sales debe conservar la actividad biológica de los péptidos de la invención pertinentes a la presente invención, es decir, la capacidad para reducir la velocidad de entrada de nutrientes hacia la circulación. Tal como se describe a continuación, las formas salinas de los péptidos pueden estar contenidas en una formulación farmacéutica.

40 Un "fragmento" de un péptido de fusión según la invención se refiere a cualquier subconjunto de las moléculas, es decir, un péptido más corto que conserva la actividad biológica deseada. Los fragmentos pueden ser preparados con facilidad retirando aminoácidos de cualquier extremo de la molécula y ensayando el resultado para sus propiedades como incretina. Las proteasas para retirar un aminoácido cada vez del extremo N-terminal y/o C-terminal de un polipéptido son conocidas, y así la determinación de los fragmentos que conservan la actividad biológica deseada sólo implica la experimentación habitual. En conclusión, los fragmentos pueden ser el resultado de deleciones de aminoácidos en los extremos terminales del péptido y/o de aminoácidos colocados dentro de la secuencia peptídica.

45 Además, el péptido de fusión de la invención que tiene actividad anti-diabetes de tipo 2, tanto si es un péptido de

- fusión en sí mismo como si es cualquiera de sus análogos, variantes, sales, derivados funcionales y/o fragmentos, también puede contener restos aminoácidos adicionales que flanquean el péptido de la invención. Con la condición de que la molécula resultante conserve su resistencia o estabilidad frente a las proteasas y su capacidad para actuar como incretina, se puede determinar si alguno de estos restos flanqueantes afecta a las características básicas y nuevas del péptido central, por ejemplo, mediante su efecto sobre las células pancreáticas, mediante experimentación habitual. La expresión “que consiste fundamentalmente en”, cuando se refiere a una secuencia especificada, significa que pueden estar presentes restos flanqueantes adicionales que no afectan a las características básicas y nuevas del péptido de la invención especificado. Esta expresión no incluye sustituciones, deleciones o adiciones dentro de la secuencia especificada.
- 5 Un “variante” según la presente invención se refiere a una molécula que es sustancialmente similar al péptido de la invención completo definido anteriormente, o a cualquiera de sus fragmentos. Los péptidos variantes pueden prepararse, de modo convencional, mediante síntesis química directa del péptido variante, utilizando métodos muy conocidos en la técnica. Por supuesto, este variante de un péptido de la invención tendrá una actividad antidiabética, por ejemplo actividad estimuladora de la insulina, similar al correspondiente péptido de GLP-1 natural.
- 10 Como alternativa, los variantes de secuencia de aminoácidos de los péptidos de fusión definidos anteriormente pueden prepararse mediante mutaciones en los ADN que codifican los derivados sintetizados. Estos variantes incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de restos dentro de la secuencia de aminoácidos. También puede realizarse cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para conseguir la construcción final, con la condición de que la construcción final posea la actividad deseada. Obviamente, las mutaciones que se produzcan en el ADN que codifica el péptido variante no deben alterar el marco de lectura y preferiblemente no crean regiones complementarias que puedan producir una estructura de ARNm secundario.
- 15 Un “análogo” de los péptidos de fusión definidos anteriormente, según la presente invención, se refiere a una molécula no natural que es sustancialmente similar a la molécula completa o a cualquiera de sus fragmentos activos. Este análogo mostrará la misma actividad que el correspondiente péptido de GLP-1 natural.
- 20 Los tipos de sustituciones que pueden realizarse en el péptido de fusión de la invención, según la presente invención, pueden basarse en el análisis de las frecuencias de cambios de aminoácidos entre una proteína/péptido homólogo de diferentes especies. Basándose en estos análisis, en la presente pueden definirse las sustituciones conservativas como intercambios dentro de los siguientes cinco grupos:
- 25 I. Restos pequeños, alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly; II. Restos polares cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln; III. Restos polares cargados positivamente: His, Arg, Lys; IV. Restos grandes, alifáticos y no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys; V. Restos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.
- 30 Dentro de los anteriores grupos, las siguientes sustituciones se consideran “altamente conservativas”: Asp/Glu; His/Arg/Lys; Phe/Tyr/Trp; Met/Leu/Ile/Val. Las sustituciones semiconservativas se definen como intercambios entre dos de los grupos (I)-(IV) anteriores que se limitan al supergrupo (A), que comprende (I), (II) y (III) anteriores, o al supergrupo (B), que comprende (IV) y (V) anteriores. Las sustituciones no se limitan a los aminoácidos codificados genéticamente ni incluso a los aminoácidos naturales.
- 35 En general, los análogos o variantes del péptido de fusión de la invención también pueden contener sustituciones de aminoácidos realizadas, por ejemplo, con la intención de mejorar la solubilidad (reemplazamiento de aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófilos). En una realización de variantes/análogos del péptido de GLP-1 del péptido de fusión de la invención (que aparece en el componente (I) y/o (III) del péptido de la invención), el péptido de GLP-1 (modificado) se caracteriza por una o más sustituciones en las posiciones 7, 8, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 33, 34, 35, 36 o 37 del péptido de GLP-1. Como ejemplo, la siguiente nomenclatura [Arg34-GLP-1(7-37)] indica un análogo de GLP-1 en el que la lisina natural en la posición 34 ha sido sustituida por arginina.
- 40 De modo específico, el componente (I) y/o (III) del péptido de fusión de la invención puede comprender variantes y análogos de GLP-1(7-35, 36 o 37) que incluyen, por ejemplo, Gln9-GLP-1(7-37), D-Gln9-GLP-1(7-37), acetil-Lys9-GLP-1(7-37), Thr16-Lys18-GLP-1(7-37), y Lys18-GLP-1(7-37), Arg34-GLP-1(7-37), Lys38-Arg26-GLP-1(7-38)-OH, Lys36-Arg26-GLP-1(7-36), Arg26,34-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26-Lys38-GLP-1(7-38), Arg26-Lys38-GLP-1(7-38), Arg34-Lys38-GLP-1(7-38), Arg37-Lys38-GLP-1(7-38), y Lys37-GLP-1(7-37).
- 45 En otra realización de la invención, el péptido de fusión de la invención contiene, como componente (I) o (III), un péptido de GLP-1 modificado que comprende la secuencia de aminoácidos de la siguiente fórmula (II) (SEQ ID NO:44):
- Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,
- 50 en la que Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, 3-hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala,



Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico, en el que Gly es particularmente preferido; Xaa16 es Val o Leu; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa19 es Tyr o Gln; Xaa20 es Leu o Met; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa25 es Ala o Val; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa27 es Glu o Leu; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa33 es Val o Lys; Xaa34 es Lys, Glu, Asn o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg, Gly o Lys o amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente.

En otra realización de la invención, el componente (I) y/o (III) del péptido de fusión de la invención contiene un péptido de GLP-1 modificado que comprende la secuencia de aminoácidos de la siguiente fórmula III (SEQ ID NO:45):

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa18-Tyr-Leu-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

en la que Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa34 es Lys, Glu o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg o Lys, amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu o Lys, amida o está ausente.

En una realización particularmente preferida de la invención, el componente (I) y/o (III) del péptido de fusión de la invención contiene un péptido de GLP-1 (modificado) que se selecciona de GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), GLP-1(7-36)-amida, GLP-1(7-37), o cualquiera de sus variantes, análogos o derivados. También se prefieren los péptidos de la invención que comprenden, en sus componentes (I) y/o (III), un péptido de GLP-1 modificado que tiene un resto Aib en la posición 8, o un resto aminoácido en la posición 7 de dicho péptido de GLP-1 que se selecciona del grupo que consiste en D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina y 4-piridilalanina.

Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden utilizarse para obtener análogos para su uso en la presente invención incluyen las etapas de cualquier método conocido, tales como las presentadas en las patentes de EEUU RE 33.653; 4.959.314; 4.588.585 y 4.737.462 de Mark et al.; 5.116.943 de Koths et al.; 4.965.195 de Namen et al.; y 5.017.691 de Lee et al.; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de EEUU 4.904.584 (Shaw et al.).

Preferiblemente, el variante o análogo, según se definió anteriormente y contenido en el componente (I), (II) y/o (III), tendrá una secuencia central que es la misma que la de la secuencia "nativa", por ejemplo, GLP-1(7-37) o GLP-2 o cualquiera de sus fragmentos biológicamente activos, o cualquier isoforma de IP-2 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de coincidencia de secuencia con la secuencia de aminoácidos nativa y conserve su actividad biológica. Más preferiblemente, esta secuencia tiene al menos 90% de coincidencia, o más preferiblemente al menos 95% de coincidencia con la secuencia nativa. Cuando se indica que un péptido concreto tiene un porcentaje de coincidencia específico con un polipéptido de referencia de una longitud definida, el porcentaje de coincidencia es con relación al péptido de referencia. Así, un péptido que es 50% idéntico (tiene una coincidencia del 50%) con un polipéptido de referencia que tiene una longitud de 100 aminoácidos puede ser un polipéptido de 50 aminoácidos que sea completamente idéntico (que coincide) con una porción con una longitud de 50 aminoácidos del polipéptido de referencia. También puede ser un polipéptido con una longitud de 100 aminoácidos, que sea 50% idéntico al polipéptido de referencia a lo largo de su longitud completa. Por supuesto, otros polipéptidos cumplirán los mismos criterios. La expresión "coincidencia de secuencia", tal como se utiliza en la presente, significa que las secuencias se comparan como sigue. Las secuencias se alinean utilizando la versión 9 del GAP ("Global Alignment Program", programa de alineamiento global) de Genetic Computing Group, utilizando la matriz por defecto (BLOSUM62) (valores -4 a +11) con una penalización de hueco abierto de -12 (para el primer nulo de un hueco) y una penalización de extensión de hueco de -4 (para cada nulo adicional consecutivo en el hueco). Después del alineamiento se calcula el porcentaje de coincidencia expresando el número de apareamientos como el porcentaje del número de aminoácidos en la secuencia solicitada.

La presente invención también incluye los derivados de un péptido de fusión o de cualquiera de sus análogos, fragmentos o variantes. El término "derivados" de un péptido de fusión de la invención pretende incluir sólo los péptidos de la invención modificados que no cambian un aminoácido por otro de los veinte aminoácidos naturales que aparecen habitualmente. Como consecuencia, un aminoácido codificado genéticamente puede modificarse haciendo que reaccione con un agente derivatizante orgánico que sea capaz de reaccionar con restos de las cadenas laterales seleccionados o con los grupos amino o carboxilo de los restos terminales (preferiblemente mediante modificación covalente), o mediante la introducción de aminoácidos no naturales (fabricados mediante síntesis química, es decir, D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético, Aib (ácido a-aminoisobutírico), Abu (ácido a-aminobutírico), Tie (terc-butilglicina), p-alanina, ácido 3-aminometilbenzoico, ácido

antranílico, o aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina, o mediante una modificación del esqueleto peptídico mediante disposiciones alternativas del esqueleto peptídico.

5 A continuación se describen las modificaciones preferidas de aminoácidos del péptido de fusión de la invención (que, tal como se definió anteriormente, también incluye los variantes, los análogos o los fragmentos del péptido de fusión), que pueden aparecer en un péptido de fusión de la invención en cualquier lugar (en cualquier aminoácido), por ejemplo, colocados en el componente (I), (II) y/o (III).

10 Los restos cisteinilo, si están presentes en cualquier forma de un péptido de fusión de la invención, por ejemplo, un análogo de un péptido de fusión de la invención, de modo más habitual se hacen reaccionar con alfa-haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboxilmetilo o carboxiamidometilo. Los restos cisteinilo también pueden derivatizarse mediante una reacción con bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta(5-imidazolil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

15 Los restos histidilo en un péptido de fusión de la invención pueden derivatizarse mediante una reacción con dietilprocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico por la cadena lateral de histidilo. El bromuro de parabromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0. En particular, el resto histidina N-terminal (His7) de GLP-1(7-37), según está contenido en el componente (I) y/o (III) del péptido de fusión de la invención, es muy importante para la actividad insulínica de los péptidos de  
20 GLP-1, según demuestran Suzuki et al. (Diabetes Res., Clinical Practice, 5 (supl. 1):S30 (1988)). Como consecuencia, el péptido de fusión de la invención puede modificarse en His7 de su GLP-1 como parte del componente (I) y/o (III) con grupos alquilo o acilo (C1-C6), o reemplazar His por estructuras de anillos C5-C6 equivalentes desde el punto de vista funcional. Una modificación preferida es la introducción de un resto hidrófobo en el amino terminal de His7 o su cadena lateral de histidilo.

25 Los restos lisinilo y amino terminal de un péptido de fusión de la invención pueden hacerse reaccionar, por ejemplo, con anhídridos del ácido succínico u otros ácidos carboxílicos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los restos lisinilo. Mediante modificaciones de acilo (C12-C18) del grupo épsilon-amino del resto o restos lisina en el péptido de fusión de la invención se aumenta su semivida en la circulación. Los restos arginilo pueden modificarse, por ejemplo, mediante una reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos  
30 fenilgloxal; y ninhidrina. La derivatización de los restos arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de la lisina, así como con el grupo épsilon-amino de la arginina.

35 La modificación específica de los restos tirosilo *per se* se ha estudiado a fondo. De modo más habitual, puede utilizarse N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetiltirosilo y derivados de e-nitro, respectivamente.

Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse de modo selectivo mediante una reacción con carbodiimidias (R'N-C-N-R'), tales como 1-ciclohexil-3-[2-morfolinil-(4-etil)]carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida.

40 Además, los restos aspartilo y glutamilo pueden convertirse en restos asparaginilo y glutaminilo mediante una reacción con iones amonio.

45 Los restos glutaminilo y asparaginilo pueden desamidarse para producir los correspondientes restos glutamilo y aspartilo. Como alternativa, estos restos pueden desamidarse bajo condiciones ácidas suaves. Cualquiera de las formas de estos restos se encuentra dentro del alcance de esta invención. Los péptidos de fusión de la invención desamidados pueden presentar una susceptibilidad alterada a la proteólisis con enzimas proteasas o peptidasas, lo cual sugiere que la desamidación puede tener una importancia fisiológica para dirigir la ruptura proteolítica de un péptido de fusión de la invención. Se observa que los péptidos de fusión de la invención biosintéticos pueden degradarse bajo ciertas condiciones de conservación, produciendo una desamidación en una o más posiciones del péptido de la invención. Los restos metionina en los péptidos de la invención pueden ser susceptibles a la oxidación, principalmente para producir el sulfóxido. Al igual que los otros derivados mencionados anteriormente, los péptidos  
50 de fusión de la invención de desamida y/o los péptidos de fusión de la invención de sulfóxido pueden utilizarse para mostrar la actividad biológica total.

Otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen alfa-aminoácidos incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzensulfónico; O-metilourea; 2,4-pentandiona; y la reacción catalizada con transaminasas con glioxilato.

55 Los restos aminoácidos terminales de un péptido de fusión de la invención con sus grupos carboxi (C-terminal) y amino (N-terminal) (así como los grupos de cadena lateral de aminoácidos de carboxi o amida, véase anteriormente) pueden estar presentes en su forma protegida (por ejemplo, el C-terminal con un grupo amida) y/o desprotegida,

utilizando los grupos protectores de amino o carboxilo apropiados. Además pueden proporcionarse sales de adición de ácidos del péptido de fusión de la invención. Las sales de adición de ácidos habituales son las sales de ácidos halohídricos, es decir, HBr, HI, o más preferiblemente HCl.

5 La PEGilación de los grupos carboxilo terminales o de cadenas laterales o del grupo épsilon-amino de la lisina que aparecen en el péptido de fusión de la invención, confiere resistencia a la oxidación y también está dentro del alcance de la presente invención.

10 Otras modificaciones que producen derivados de los péptidos de fusión de la invención se basan en carbohidratos y/o lípidos que pueden acoplarse covalentemente al péptido de fusión de la invención. Se prefieren acoplar lípidos y/o carbohidratos a serina, trenonina, asparagina, glutamina o tirosina, o glutamato o aspartato a través de su restos de cadena lateral reactivos. Como alternativa, los carbohidratos y/o los lípidos también pueden unirse a los restos terminales del péptido de fusión de la invención. Además, un péptido de fusión de la invención puede acoplarse a un resto de un péptido o una proteína diferente desde el punto de vista funcional, que también puede estabilizar el péptido de fusión de la invención y/o puede actuar para mejorar las propiedades de transporte de un péptido de fusión de la invención en los fluidos corporales, en particular la sangre. Los péptidos o las proteínas adecuados pueden seleccionarse, por ejemplo, de albúmina, transferrina, etc., que se acoplan directamente (como componente 15 IV) al péptido de fusión de la invención, o a través de una secuencia conectora peptídica u orgánica. Preferiblemente, estos péptidos o proteínas se unen a uno de los extremos terminales del péptido de fusión de la invención.

20 Para evitar el problema de la degradación del péptido de fusión de la invención, otra realización de la presente invención proporciona un isómero retro-inverso del péptido de fusión de la invención compuesto de D-aminoácidos o al menos parcialmente compuesto de D-aminoácidos. La expresión "isómero retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el que la dirección de la secuencia está invertida y la quiralidad de cada resto aminoácido está invertida (véase, por ejemplo, Jameson et al., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady et al., Nature, 368, 692-693 (1994)). Con respecto al péptido de origen, el péptido retro-inverso se monta en orden inverso de aminoácidos, generalmente con derivados de aminoácidos F-moc. Generalmente, los péptidos brutos pueden purificarse mediante HPLC en fase inversa. 25

30 Otras modificaciones que pueden introducirse en los péptidos de fusión de la invención se refieren a modificaciones del esqueleto peptídico. Los péptidos de fusión de la invención modificados son miméticos de andamiaje. Su esqueleto es diferente del esqueleto natural, mientras que sus estructuras de cadenas laterales son idénticas a las de los péptidos de fusión de la invención o sus fragmentos, variantes, derivados o análogos. En general, los miméticos de andamiaje muestran una modificación de uno o más de los miembros de la cadena del esqueleto (NH, CH, CO), como una sustitución (preferiblemente) o como una inserción. Los sustituyentes son, por ejemplo, (I) -O-, -S-, o -CH<sub>2</sub>-, en lugar de -NH-; (II) -N-, C-alquilo, o -BH-, en lugar de -CHR-; y (III) -CS-, -CH<sub>2</sub>-, -SO<sub>n</sub>-, -P=O(OH)-, o -B(OH)-, en lugar de -CO-. Un mimético peptídico de un péptido de fusión de la invención puede ser una combinación de cada una de estas modificaciones. En particular, pueden combinarse modificaciones de cada uno de los grupos I, II y III. En un mimético peptídico, cada miembro de la cadena del esqueleto puede modificarse o, como alternativa, sólo un cierto número de miembros de la cadena puede intercambiarse por un resto no natural. Preferiblemente, todos los miembros de la cadena del esqueleto de un péptido de fusión de la invención de -NH-, -CHR- o CO se intercambian por otro grupo no natural. En el caso en que el enlace amida (-CO-NH-) del esqueleto del péptido de la invención esté sustituido (en la molécula entera o al menos en una sola posición), los restos de sustitución preferibles son biosustitúidos, por ejemplo, enlaces amida retro-inversos (-NH-CO-), hidroxietileno (-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-), alqueno (CH<sub>2</sub>=CH-), carba (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y/o -P=O(OH)-CH<sub>2</sub>-). Como alternativa, pueden producirse alargamientos de la cadena del esqueleto mediante inserciones en un mimético de andamiaje del péptido de fusión de la invención, por ejemplo, con restos que flanquean el átomo C-alfa. A cada lado del átomo C-alfa puede insertarse, por ejemplo, -O-, -S-, -CH-, -NH-. 45

50 Se prefiere particularmente una estructura de esqueleto peptídico de oligocarbamato de los péptidos de fusión de la invención. El enlace amida se reemplaza por un resto carbamato. Los carbonatos de aminoalquilo N-prottegidos monoméricos son accesibles a través de los correspondientes aminoácidos o aminoalcoholes. Se convierten en ésteres activos, por ejemplo, p-nitrofenil éster, utilizando el resto F-moc o un grupo nitroatriloalquilo fotosensible mediante síntesis en fase sólida.

55 Los péptidos de fusión de la invención están protegidos contra la ruptura proteolítica como se definió anteriormente. En particular, están protegidos frente a la dipeptidil aminopeptidasa-4 (DPP-IV). La expresión "protegido frente a DPP-IV", tal como emplea en la presente, se refiere a un péptido según la reivindicación 1. Los péptidos de fusión de la invención, así como sus derivados, análogos, fragmentos y variantes, hacen que GLP-1(7-35, 36 o 37), como parte del componente (I) y/o (III) del péptido de fusión de la invención, sea resistente frente a las peptidasas plasmáticas (DPP-IV).

La resistencia de un péptido a la degradación por dipeptidil aminopeptidasa IV se determina, por ejemplo, mediante el siguiente ensayo de degradación: se incuban partes alícuotas de los péptidos de fusión a 37 °C con una parte alícuota de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada durante 4-22 horas en un tampón apropiado a pH 7-8 (el tampón

no puede ser albúmina). Las reacciones enzimáticas se terminan mediante la adición de ácido trifluoroacético, y los productos de degradación de los péptidos se separan y se cuantifican utilizando análisis de HPLC o LC-MS. Un método para realizar este análisis es el siguiente. Las mezclas se aplican a una columna Zorbax300SB-C18 (poros de 30 nm, partículas de 5 µm) de 150 x 2,1 mm, y se eluye con un caudal de 0,5 ml/min con un gradiente lineal de acetronitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% (acetronitrilo al 0%-100% a lo largo de 30 min). Los péptidos y sus productos de degradación pueden controlarse mediante su absorbancia a 214 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican mediante la integración del área de sus picos. El patrón de degradación puede determinarse utilizando LC-MC, pudiéndose determinar los espectros de MS del pico separado. Se emplea el porcentaje de compuesto intacto/degradado en un momento concreto para calcular la estabilidad frente a DPP-IV de los péptidos.

Un péptido de fusión de la invención se define como estabilizado frente a DPP-IV cuando es 10 veces más estable que GLP-1(7-37) basándose en el porcentaje de compuesto intacto en un momento concreto. Así, un péptido de fusión de la invención estabilizado frente a DPP-IV es preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20 veces más estable que GLP-1(7-37) como tal. La estabilidad puede evaluarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante la adición de DPP-IV a una disolución del péptido de fusión que se va a ensayar, y la determinación de la degradación del péptido de fusión, por ejemplo a lo largo del tiempo, mediante, por ejemplo, un método espectroscópico, un análisis de la transferencia Western, una selección con anticuerpos, etc. En paralelo, un péptido de fusión de la invención se define como un compuesto que ejerce el efecto de GLP-1(7-37), por ejemplo uniéndose a su receptor nativo (receptor de GLP-1). Preferiblemente, un péptido de fusión de la invención tiene una afinidad de unión por el receptor de GLP-1 que se corresponde con al menos 10%, preferiblemente al menos 50% de la afinidad de unión del péptido de GLP-1 natural. La afinidad de unión puede determinarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, resonancia de plasmón de superficie, etc. Además, se prefiere que el péptido de la invención evoque la formación de AMPc intracelular mediante su unión a su receptor extracelular, que transmite la señal hacia la célula.

Los péptidos de fusión de la invención pueden producirse de modo sintético, utilizando técnicas de síntesis peptídica en fase sólida, de modo similar a la manera de producción de GLP-1(7-37)amida y GLP-1(7-37) en la técnica, y pueden purificarse después a escala de laboratorio, por ejemplo, mediante una única etapa de purificación en una columna de HPLC de fase inversa o con métodos de cromatografía adecuados.

Sin embargo, preferiblemente se forman en células modificadas, tanto en células microbianas como en líneas de células animales para producir el péptido de fusión de la invención. El péptido de fusión de la invención puede aislarse de las células en que se expresa, por ejemplo utilizando técnicas de separación convencionales. Por tanto, las células pueden cultivarse en condiciones apropiadas, por ejemplo que incluyan un soporte y nutrientes, *in vitro*, y se recupera una proteína segregada, es decir, el péptido de fusión de la invención, del medio extracelular. Así las secuencias introducidas en las células preferiblemente incluyen secuencias conductoras y secuencias de péptidos señal que dirigen la secreción del péptido de fusión de la invención. Las células preferiblemente expresan una proteasa capaz de romper las secuencias conductoras y señal, de modo endógeno o con secuencias génicas modificadas. Como alternativa, las secuencias génicas modificadas que codifican un péptido de fusión de la invención no incluyen estas secuencias conductoras y de péptido señal, por lo que el péptido de fusión de la invención expresado de modo intracelular no se secretará, y se recuperará de las células mediante procesos que implican la lisis celular. En estos métodos, las secuencias codificadoras pueden incluir marcadores de purificación que permiten una extracción eficaz del péptido producto del medio, y estos marcadores pueden romperse para liberar el péptido de la invención aislado.

La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica el péptido de fusión de la invención, tanto el péptido de fusión como cualquiera de sus fragmentos, análogos o variantes. La presente invención incluye cualquier ácido nucleico que codifique un péptido de fusión de la invención. Debido a la degeneración del código genético, una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos pueden codificar un péptido de fusión de la invención. Una molécula de ácido nucleico dentro del alcance de la presente invención también puede contener el ácido nucleico que codifica el péptido de fusión de la invención y, además, otras secuencias nucleotídicas (funcionales). En una realización preferida de la presente invención, esta otra molécula de ácido nucleico puede codificar (a) la secuencia de aa de GLP-1 completa, la secuencia de GLP-1(7-37) o de GLP-1(7-37, 36 o 37) funcional, (b) una secuencia de ruptura en el N-terminal de la secuencia de GLP-1 según (a) para cualquier proteasa, y cadena arriba de (b) puede codificar una secuencia conductora. En otra realización preferida, cadena arriba de la secuencia del ácido nucleico que codifica (b), la molécula de ácido nucleico también puede comprender (c) una secuencia que codifica un péptido señal. Como alternativa, la molécula de ácido nucleico de la invención puede tener una secuencia (c) condensada cadena arriba de (a) sin ninguna secuencia que codifique una secuencia conductora (b) entre medias. Preferiblemente, la secuencia conductora y la secuencia del péptido señal son heterólogas con el preproglucagón.

La invención también proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la invención (molécula) y otros componentes funcionales para la expresión del ácido nucleico de la invención (molécula). Generalmente, el ácido nucleico de la invención (molécula) se condensará a una secuencia promotora y, finalmente se combinará con otras secuencias reguladoras, por ejemplo, una secuencia potenciadora. Para la replicación, el plásmido puede contener un origen de la replicación. Para seleccionar células transfectadas con el vector de la invención, pueden

proporcionarse en el vector uno o más genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, ampicilina). El vector puede ser un plásmido que incluya un promotor de origen bacteriano, y genes de resistencia a antibióticos y un promotor de origen, y genes de resistencia a antibióticos para la replicación y la expresión en células de mamífero. La invención también proporciona una célula hospedante que comprende ADN de la invención introducido de modo exógeno capaz de traducir dicha proteína precursora. La célula hospedante puede ser una célula hospedante procarionota o una célula hospedante eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero. Sin embargo, la célula hospedante no es una célula precursora embrionaria humana ni una célula germinal humana.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del péptido de fusión de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un animal, preferiblemente un ser humano, mediante la administración de un péptido de la invención que comprende los componentes (I) y (II), y finalmente el componente (III). También se proporciona el uso correspondiente de dichos péptidos de la invención para la fabricación de un producto para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno asociado con el metabolismo de la glucosa. Los ejemplos no limitantes de trastornos de la glucosa incluyen la diabetes mellitus de tipo I o de tipo II (NIDDM), o la resistencia a la insulina, trastornos del peso y enfermedades o afecciones asociadas con ellos, en los que dichos trastornos del peso o afecciones asociadas incluyen obesidad, trastornos asociados al sobrepeso, desregulación de la saciedad, niveles de insulina plasmática reducidos, niveles de glucosa sanguínea aumentados, o masa reducida de células beta pancreáticas. Preferiblemente, el uso de los péptido de fusión de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 (NIDDM) se describe a continuación. Como consecuencia, la presente invención se refiere al uso del péptido de la invención, por ejemplo, para disminuir el peso de un sujeto, para reducir la saciedad de un sujeto, para aumentar postprandialmente los niveles de insulina plasmática en un sujeto, para reducir el nivel de glucosa sanguínea en ayunas en un sujeto, para aumentar la masa de células beta pancreáticas en un sujeto, o para tratar la diabetes de tipo I o de tipo II en un sujeto.

Pueden tratarse pacientes con otras enfermedades o trastornos con los péptidos de fusión de la invención, es decir, los péptidos de fusión o también sus análogos, fragmentos, variantes o derivados. Los péptidos de fusión de la invención pueden utilizarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos neurodegenerativos o de afecciones asociadas con la apoptosis. El uso del péptido de fusión de la invención para tratar estos trastornos resulta de lo siguiente: los receptor de GLP-1, que están acoplados a la vía del segundo mensajero de AMP cíclico, se expresan a través del cerebro de roedores y seres humanos. La quimioarquitectura de la distribución de receptores en el cerebro no sólo se correlaciona con un papel central del GLP-1 en la regulación de la ingesta de alimento y la respuesta al estrés aversivo. También se ha demostrado que la unión del GLP-1 a su receptor de GLP-1 ejerce propiedades neurotróficas, y ofrece protección frente a la apoptosis inducida por glutamato y lesiones oxidativas en células neuronales cultivadas. Además, se ha demostrado que GLP-1 modifica el procesamiento del precursor de proteína  $\beta$  amiloide en cultivo celular y reduce, de una manera dependiente de la dosis, los niveles de péptido- $\beta$  amiloide en el cerebro *in vivo*. Por tanto, también se sabe que el GLP-1 es un regulador del sistema nervioso central. Los péptidos de fusión de la invención que imitan la actividad biológica del GLP-1 fisiológicamente activo tienen importancia terapéutica en el tratamiento, por ejemplo, de la enfermedad de Alzheimer (AD) y otros trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, ataxia-telangiectasia, enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, esclerosis múltiple, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Pick, ataxia espinoocerebelar, enfermedad de Schilder, y enfermedad de Parkinson).

Además, se ha demostrado que el GLP-1 fisiológicamente activo ejerce una acción antiapoptótica sobre diversas células, por ejemplo, el GLP-1 es beneficioso para conservar la masa y la función de islotes humanos recién aislados u otros tipos de células. En esta medida, el péptido de fusión de la invención biológicamente activo puede utilizarse para tratar trastornos que son provocados por la apoptosis de células o tejidos.

El uso de un péptido de fusión de la invención puede ser para la fabricación de una composición que se administra de modo exógeno, y comprende el péptido de fusión de la invención aislado. La composición resultante puede utilizarse también para el tratamiento de los anteriores trastornos. Los trastornos descritos en la presente también pueden tratarse mediante células hospedantes, ácidos nucleicos (moléculas) o vectores de la invención, o más bien las células hospedantes, los ácidos nucleicos (moléculas) o los vectores de la invención pueden utilizarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de estos trastornos.

La preparación de formulaciones que contienen secuencias de péptidos de fusión de la invención como ingrediente activos en general es bien entendida en la técnica, como por ejemplo las patentes de EEUU 4.608.251, 4.601.903, 4.599.231, 4.599.230, 4.596.792, y 4.578.770. Generalmente, estas formulaciones se preparan como inyectables como disoluciones o suspensiones líquidas, que contienen preferiblemente agua (formulación acuosa), o pueden estar emulsionadas. La expresión "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50% en p/p de agua. De forma similar, la expresión "disolución acuosa" se define como una disolución que comprende al menos 50% en p/p de agua, y la expresión "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50% en p/p de agua.

Para una inyección intravenosa, cutánea o subcutánea o para una inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que es apirógena y tiene un pH, una

isotonicidad y una estabilidad adecuados. Las composiciones farmacéuticas líquidas en general incluyen un vehículo líquido, tal como agua. Preferiblemente, el vehículo líquido incluirá una disolución salina fisiológica, dextrosa etanol u otra disolución de sacáridos, o pueden incluirse glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol, o sus combinaciones. Más ejemplos son otros vehículos isotónicos, tales como inyección de Ringer o inyección de Ringer lactada.

La invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una disolución acuosa de un compuesto según la presente invención y un tampón, en la que dicho compuesto está presente a una concentración de 0,1 mg/ml o mayor, y en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0, preferiblemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5. Preferiblemente, el pH de la formulación es al menos 1 unidad de pH desde el punto isoeléctrico del compuesto según la presente invención, aún más preferiblemente el pH de formulación es al menos 2 unidades de pH desde el punto isoeléctrico del compuesto según la presente invención.

También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución o la suspensión en un líquido antes de la inyección. La formulación farmacéutica puede ser una formulación liofilizada, a la que el médico o el paciente añade los disolventes y/o los diluyentes antes del uso. En otras palabras, la formulación ya preparada puede no ser administrada inmediatamente al sujeto. En su lugar, tras la preparación se envasa para su conservación en estado congelado, o en forma secada para después reconstituir en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación secada (por ejemplo, liofilizada o secada por pulverización) lista para usar sin disolución anterior. Una "forma secada" significa que la formulación o la composición farmacéutica líquida se seca mediante liofilización (véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984), *J. Parental Sci. Technol.*, 38:48-59), secado por pulverización (véase, Masters (1991), en *Spray-Drying Handbook* (5ª ed., Longman Scientific and Technical, Essex, Reino Unido, pp. 491-676; Broadhead et al. (1992), *Drug Devel. Ind. Pharm.*, 18:1169-1206; y Mumenthaler et al. (1994), *Pharm. Res.*, 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988), *Cryobiology*, 25:459-470; y Roser (1991), *Biopharm.*, 4:47-53). La formación de agregados de un polipéptido durante la conservación de una composición farmacéutica líquida puede afectar de modo adverso a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado una pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas, tales como el bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene el polipéptido se administra utilizando un sistema de infusión.

Es posible que estén presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica peptídica de la presente invención. Estos otros ingredientes pueden incluir agente humectantes, emulgentes, antioxidantes, agentes de carga, agentes tamponantes del pH (por ejemplo, tampones fosfato, citrato o maleato), conservantes, tensioactivos, estabilizantes, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humana, gelatina o proteínas) y/o iones bipolares (por ejemplo, un aminoácido, tal como betaina, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina).

Con respecto a los estabilizantes para las formulaciones de la invención, estos pueden seleccionarse preferiblemente del grupo de polímeros de alto peso molecular o de compuestos de bajo peso molecular. En otra realización de la invención, el estabilizante se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxihidroxixelulosa o sus derivados (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre, tales como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol, y diferentes sales (por ejemplo, cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender otros agentes estabilizantes, que aumenten aún más la estabilidad del polipéptido terapéutico activo contenido. Los agentes estabilizantes de interés particular para la presente invención incluyen, pero no se limitan a metionina y EDTA, que protegen al polipéptido frente a la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido frente a la agregación asociada con la congelación-descongelación o el cizallamiento mecánico.

Con respecto a los tensioactivos para las formulaciones de la invención, estos puede seleccionarse preferiblemente de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, copolímeros en bloque de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, poloxámeros, tales como Pluronic F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno, PEO con forma de estrella, derivados de polioxietileno y polietileno, tales como derivados alquilados y alcoxilados (Tween, por ejemplo, Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), polioxietilenhidroxiestearato, monoglicéridos o sus derivados etoxilados, diglicéridos o sus derivados de polioxietileno, alcoholes, glicerol, lecitinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoilfosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil-lisofosfatidil-L-serina y ésteres 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados de alquilo, alcoxi (alquil éster) y alcoxi (alquil éter) de lisofosfatidil- y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir, colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y los cargados positivamente DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas),

5 gliceroglicolípidos (por ejemplo, galactopiransoide), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos),  
 10 dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados del ácido fusídico (por ejemplo, taurodihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sus sales C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico),  
 15 acilcarnitinas y sus derivados, derivados N'X-acilados de lisina, arginina o histidina, o los derivados acilados en la cadena lateral de lisina, o arginina, los derivados N-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivados N-acetilados de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato sodio, nº de registro CAS [577-11-7]; docusato calcio, nº de registro CAS [128-49-4]; docusato potasio, nº de registro CAS [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o sus derivados, ácidos biliares y sus sales, y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propansulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), tensioactivos bipolares (por ejemplo, N-alquil-N, N-dimetilammonio-1-propansulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilammonio-1-propansulfonato), tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, dodecil-D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, Tetronic), que son copolímeros en bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo puede seleccionarse del grupo de derivados de imidazolina o sus mezclas. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es muy conocido por los expertos en la técnica. Por facilitar, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

25 Con respecto a los conservantes farmacéuticamente aceptables, estos pueden seleccionarse preferiblemente del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, etanol, clorobutanol, y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropan-1,2-diol) o sus mezclas.

30 Con respecto a los agentes isotónicos, estos pueden seleccionarse preferiblemente del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o un alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propandiol (propilenglicol), 1,3-propandiol, 1,3-butandiol), polietilenglicol (por ejemplo, PEG400), o sus mezclas. Puede utilizarse cualquier azúcar, tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, que incluyen, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización, el aditivo de azúcar es sacarosa. Un alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galacititol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En una realización, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o los alcoholes de azúcares mencionados anteriormente pueden utilizarse por sí solos o en combinación. No existe un límite fijo de la cantidad utilizada, con la condición de que el azúcar o el alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecto de modo adverso a los efectos estabilizantes logrados utilizando los métodos de la invención.

40 Con respecto a los agentes quelantes, estos pueden seleccionarse preferiblemente de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y sus mezclas.

45 Con respecto a los tampones, estos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dibifosfato de sodio, bifosfato de disodio, fosfato de sodio, y tri(hidroximetil)aminometano, HEPES, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o sus mezclas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

El uso de todos los aditivos mencionados anteriormente en las composiciones farmacéuticas que contienen el péptido de fusión de la invención es muy conocido por los expertos en la técnica, en particular con respecto a sus intervalos de concentración. Por facilitar, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

50 Las formulaciones que contienen el péptido de fusión de la invención se administran de modo convencional por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica, subdérmica o intramuscular. Una composición para la administración parenteral del péptido de la invención puede prepararse, por ejemplo, como se describe en el documento WO 03/002136.

55 Otras formulaciones que son adecuadas para otros modo de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales, bucales, sublinguales, intraperitoneales, intravaginales, anales e intracraneales. Para los supositorios, los ligantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; estos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente 12%. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sodio, celulosa,

carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, y contienen del 10-95% del ingrediente activo, preferiblemente 25-70%.

5 Tal como se mencionó anteriormente, pueden emplearse otros métodos farmacéuticos para controlar la duración de la acción. Pueden conseguirse preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para complejar o absorber un péptido de fusión de la presente invención. El transporte controlado del ingrediente activo (péptido de fusión) puede realizarse seleccionando macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, y sulfato de protamina), la concentración de las macromoléculas, así como los métodos de incorporación. Estas indicaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (véase anteriormente). Otro método posible para controlar la duración de la acción con preparaciones de liberación controlada consiste en incorporar un péptido de la presente invención en partículas de un material polimérico, tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli(ácido láctico), o copolímeros de etileno-acetato de vinilo.

15 Los péptidos de fusión de la invención pueden formularse como formas neutras o salinas. Un péptido de fusión de la presente invención puede ser lo suficientemente ácido o lo suficientemente básico como para reaccionar con cualquiera de una serie de bases orgánicas e inorgánicas, y de ácidos orgánicos e inorgánicos, para formar una sal (de adición), por ejemplo formada con los grupos amino libres del péptido. Los ácidos que se emplean habitualmente para formar sales de adición de ácidos son ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos, tales como ácido tartárico, ácido asp-toluensulfónico, ácido metansulfónico, ácido oxálico, ácido mandélico, ácido p-bromofenilsulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, y ácido benzoico. Los ejemplos de dichas sales incluyen las sales sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monobifosfato, dibifosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butin-1,4-dioato, hexin-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilensulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxi-butirato, glicolato, tartrato, metansulfonato, y propansulfonato. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, y similares. Las sales de adición de ácidos, las sales carboxilato, los ésteres de alquilo inferior, y las amidas de los péptidos de la invención pueden formularse según los documentos WO 91/11457 (1991), EP 0.733.644 (1996), y U.S. 5.512.549 (1996).

35 Las formulaciones que contienen secuencias del péptido de fusión de la invención se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. La cantidad que se administrará dependerá del sujeto que se va a tratar, incluyendo, por ejemplo, la gravedad de la enfermedad del paciente. Los intervalos de dosificación adecuados son, por ejemplo, del orden de varios cientos de microgramos de ingrediente activo por dosis terapéutica, con un intervalo preferido de aproximadamente 0,1 µg a 2000 µg (aunque se contemplan cantidades mayores en el intervalo de 1-10 mg), tal como en el intervalo de aproximadamente 0,5 µg a 1000 µg, preferiblemente en el intervalo de 1 µg a 500 µg, y en especial en el intervalo de aproximadamente 10 µg a 100 µg.

40 Las formulaciones que contienen los péptidos de fusión de la invención más, por ejemplo, excipientes adicionales, por ejemplo, glicina y manitol u otros aditivos, pueden comercializarse en una forma liofilizada como viales. Se proporciona un vial de diluyente acompañante que permite que el paciente reconstituya el producto hasta la concentración deseada antes de la administración de la dosis. Las formulaciones de la invención también pueden comercializarse en otras maneras muy conocidas, tales como jeringas prerrellenas, etc.

45 La invención se ilustra más a fondo con los ejemplos adjuntos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Creación de construcciones genéticas

50 La secuencia codificadora del ADNc de GLP-1(7-37) se sintetizó de modo sintético, en una secuencia que incluye sitios HincII y EcoRI, según se indica en la figura 1a. Se sintetizó por separado el ADNc ilustrado en la figura 1b, que incluye las secuencias codificadoras de GLP-1(7-37), IP-2 y sitios de restricción para SfoI, EcoRI y XbaI, según se ilustra en la figura 1b. Para dirigir a GLP-1 hacia la vía secretora, se emplea la secuencia señal heteróloga de la estromelina 3 (nº de registro NM\_005940). Por tanto, el ADNc que codifica la señal de estromelina y la secuencia conductora se amplificó con PCR de transcriptasa inversa a partir de ARN humano, y se empleó con la construcción de la figura 1a o la figura 1b para formar la construcción mostrada en la figura 1c y en la figura 1d, respectivamente.

55 El fragmento HincII/EcoRI de la construcción de la figura 1a se clona en el sitio SfoI de la secuencia de la figura 1d para formar la construcción de la figura 1e. De manera similar, el fragmento EcoRI de la figura 1d se clona en el sitio EcoRI de un plásmido de expresión eucariota para producir la construcción mostrada en la figura 1f. Para formar la construcción mostrada en la figura 1g, el fragmento HincII/XbaI de la construcción mostrada en la figura 1b se clona



reiteradamente en el sitio SfoI/XbaI de la construcción mostrada en la figura 1d. La figura 1h muestra una secuencia sintetizada optimizada para los codones que codifica las secuencias señal y conductora de estromelina interrumpidas por una secuencia de intrón endógeno acortada, condensada a secuencias que codifican GLP-1(7-37), IP-1 y GLP-2(1-35) humanos. La secuencia de ADN de la construcción de la figura 1h es SEQ ID NO:16, mientras que SEQ ID NO:15 muestra también la secuencia del péptido traducido.

También se sintetizan las secuencias en las figuras 1i y 1j. Estas entonces se utilizaron para formar la construcción de la figura 1k, clonando el fragmento NaeI/BssHII de la figura 1j en la secuencia linealizada NaeI/BssHII de la figura 1h. La secuencia de ADN de la construcción de la figura 1k es SEQ ID NO:14, mientras que SEQ ID NO:13 muestra también la secuencia del péptido traducido. La construcción de la figura 1l está formada por una digestión con BssHII y un reacoplamiento de la secuencia de la figura 1h. La secuencia de ADN de la construcción de la figura 1l es SEQ ID NO:18, mientras que SEQ ID NO:17 muestra también la secuencia del péptido traducido. La construcción de la figura 1m está formada por la clonación del fragmento Afel/BssHII de la secuencia de la figura 1i en la secuencia linealizada Afel/BssHII de la figura 1h. La secuencia de ADN de la construcción de la figura 1m es SEQ ID NO:20, mientras que SEQ ID NO:19 muestra también la secuencia del péptido traducido.

Las construcciones anteriores pueden ser fabricadas por los expertos en la técnica utilizando técnicas habituales.

**Ejemplo 2: Transfección, selección clonal y expresión de GLP-1 en células de mamífero**

Fuente de las células: HEK293 (línea celular de riñón embrionario humano, nº ACC 305, DSMZ Cell Culture Collection, Alemania), AtT20 (línea celular de tumor de glándula pituitaria LAF1 de ratón, nº 87021902, European Cell Culture Collection, Reino Unido), las células hTERT-MSC fueron generadas por el profesor Kassem, University Hospital of Odense, Dinamarca.

Para la transfección de  $10^6$  células, se emplearon 0,5-2 µg de ADN plasmídico con diferentes construcciones de GLP-1. Las construcciones se generaron como se describe en el ejemplo 1. Las células HEK293 se transfectaron mediante el método de coprecipitación de fosfato de calcio convencional, según se describe en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1994ff, Harvard Medical School, vol. 2, unidad 9.1). Las células AtT20 se transfectaron utilizando FuGene (Roche) según se describe en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1994ff, Harvard Medical School, vol. 2, unidad 9.4). La transfección de células hTERT-MSC se realizó utilizando la tecnología Nucleofactor (Amaxa), un método no vírico que se basa en la combinación de parámetros eléctricos y disoluciones específicas del tipo celular. Utilizando el dispositivo Nucleofactor (programa C17) y la disolución de Nucleofactor VPE-1001 se han logrado unas eficacias de transfección >60%. Cuarenta y ocho horas después de la transfección se realizó la selección de los clones celulares con integración estable de ADN en el cromosoma, añadiendo el agente selectivo blasticidina (2 µg/ml) al medio de cultivo. Después de 12-15 días, los clones de células transfectadas estables pueden aislarse y expandirse para la caracterización.

Se midió la expresión transitoria de diferentes construcciones de GLP-1 en células hTERT-MSC y HEK293. Mientras que sólo pudo encontrarse un nivel de GLP-1 activo marginal en las construcciones de GLP-1 monoméricas nº 103 y nº 317 (que tienen sólo una copia de GLP-1(7-37)), pudo observarse un enorme aumento en la expresión en la construcción de GLP-1 dimérica nº 217 (que tiene GLP-1(7-37) como componente (I) y como componente (III)), en células hTERT-MSC y en células HEK293. Los resultados se resumen en la figura 2. Un alargamiento de la construcción hasta la construcción de GLP-1 nº 159 (que tiene cuatro copias de IP-2 como componente (II)) no produce un aumento mayor significativo (no se muestra). Después de la transfección de las células hTERT-MSC con diferentes construcciones se seleccionaron los clones que expresan de modo estable GLP-1. Los niveles de expresión se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

construcción	clon celular	GLP activo por $10^6$ células y hora [pmol]
nº 103-GLP-1 <sub>(7-37)</sub>	49TM113/13	0,4
nº 317-GLP-1 <sub>(7-37)</sub> -IP-2-11aa	71TM169/1	0,3
nº 217-GLP-1 <sub>(7-37)</sub> -IP-2-GLP-1 <sub>(7-37)</sub>	79TM217/13	2,7

**Ejemplo 3: Análisis de la transferencia Western de péptidos de GLP-1, segregados de células de mamífero**

Se separó el sobrenadante del cultivo celular de las células secretoras de GLP-1 en un gradiente de SDS-PAGE al 10%-20% (120 V, 90 minutos) y se trasladó a una membrana de PVDF (membrana Immobilon-P, 0,45 µm, Millipore IPVH 00010) mediante transferencia semiseca (2,0 mA/cm<sup>2</sup>, 60 minutos). Después de la fijación con metanol y un bloqueo (BSA al 3% (en p:v), Tween-20 al 0,1% (en v:v) en PBS), la membrana se inmunotransfirió con 1 µg/ml de anticuerpo anti-GLP-1 (HYB 147-12, Antibodyshop) a 4 °C durante la noche. Después de un lavado y una incubación

con 0,02 µg/ml de anticuerpo de detección (IgG anti-ratón, conjugado con HRP, Perkin Elmer PC 2855-1197) a temperatura ambiente durante 4 horas, la detección de la quimioluminiscencia revela la localización de la proteína.

El análisis de la transferencia Western se muestra en la figura 3 (1: 100 ng de GLP-1(7-37) sintético disueltos en sobrenadante de células hTERT-MSC transfectadas de modo simulado; 2: sobrenadante de células hTERT-MSC (clon 79TM217/13) que segregan GLP-1 dimérico de la construcción nº 217; 3: sobrenadante de células AtT20 (clon 81-A-217/3) que segregan GLP-1 dimérico de la construcción nº 217; M: marcador de proteína preteñido [kDa]). Los resultados demuestran que los péptidos de la invención que contienen GLP-1(7-37) y un apéndice C-terminal (2 y 3 en la figura 3) se segregan de las líneas celulares transfectadas y pueden detectarse utilizando un anticuerpo anti-GLP-1, que se une a los epítopos dentro de la molécula de GLP-1(7-37).

#### 10 Ejemplo 4: Estabilidad en plasma *in vitro* de péptidos GLP-1 segregados de células humanas

Células HEK293 y hTERT-MSC se transfectaron de modo transitorio con construcciones que codifican la secuencia señal de estromelina heteróloga, que está unida a variantes de GLP-1 que codifican los siguientes péptidos:

1: GLP-1(7-37)

2: GLP-1(7-37)-IP-2-extendido con 11 aa

15 3: GLP-1(7-37)-IP-2-GLP-1(7-37)

El sobrenadante del cultivo celular, que contiene péptidos de GLP-1 segregados desde las células o GLP-1(7-37) sintético (Bachem), se incubó con plasma enriquecido con linfocitos humano que contenía una actividad dipeptidilpeptidasa a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 o 4 horas. El GLP-1(7-37) sintético en el sobrenadante de las células transfectadas de modo simulado se empleó como control positivo para la actividad DPP-IV, que fue inhibida por la adición de un inhibidor de DPP-IV (nº DPP4, Biotrend). Se midió el GLP activo utilizando un ELISA de GLP-1 (activo) (nº EGLP-35K, Biotrend), utilizando un anticuerpo que se une al epítopo N-terminal de GLP-1(7-37) que discrimina al péptido GLP-1(9-37) inactivo degradado con DPP-IV.

Los resultados se muestran en las figuras 4 (células HEK293) y 5 (células hTERT-MSC). Las células HEK293 y hTERT-MSC son hospedantes eficaces para la construcción de genes. La numeración de los resultados para las células transfectadas de tipos 1 a 3 es como en el ejemplo 3 (1: 100 ng de GLP-1(7-37) sintético disueltos en sobrenadante de células hTERT-MSC transfectadas de modo simulado; 2: sobrenadante de células hTERT-MSC (clon 79TM217/13) que segregan GLP-1 dimérico de la construcción nº 217; 3: sobrenadante de células AtT20 (clon 81-A-217/3) que segregan GLP-1 dimérico de la construcción nº 217). Mientras que la construcción 1 produce GLP-1 de tipo salvaje que es inactivado por DPP-IV de una manera similar al GLP-1 sintético, las formas de GLP-1 alargadas en el C-terminal de la invención (2 y 3 en la figura 4, 3 en la figura 5) son más resistentes a la degradación y mantienen una actividad de al menos 40%. Los péptidos de GLP-1 extendidos en el C-terminal se estabilizan significativamente en el plasma humano *in vitro*. El péptido con la secuencia de GLP-1 dimérica (3) está casi totalmente estabilizado frente a la degradación por DPP-IV *in vitro*.

#### Ejemplo 5: Análisis de la transferencia Western de péptidos de GLP-1

Se produjeron de modo sintético diversos péptidos de GLP-1 (no según las reivindicaciones) mediante fase sólida (*sin*) o recombinante utilizando *E. coli* (*rec*). Se separaron péptidos de GLP-1 (31 ng de SEQ ID NO:1 y 10 ng de cada una de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8) en un gradiente de SDS-PAGE del 10%-20% (120 V, 90 minutos) y se trasladó a una membrana de PVDF (membrana Immobilon-P, 0,45 µm, Millipore IPVH 00010) mediante transferencia semiseca (2,0 mA/cm<sup>2</sup>, 60 minutos). Después de la fijación con metanol y un bloqueo (BSA al 3% (en p:v), Tween-20 al 0,1% (en v:v) en PBS), la membrana se inmunotransfirió con 1 µg/ml de anticuerpo anti-GLP-1 (HYB 147-12, Antibodyshop) a 4 °C durante la noche. Después de un lavado y una incubación con 0,02 µg/ml de anticuerpo de detección (IgG anti-ratón, conjugado con HRP, Perkin Elmer PC 2855-1197) a temperatura ambiente durante 4 horas, la detección de la quimioluminiscencia revela la localización de la proteína. La figura 6 muestra una transferencia Western para los péptidos indicados. Pueden ofrecerse los siguientes valores: SEQ ID NO:1 (ID1<sub>sin</sub>) se corresponde con GLP-1(7-37), 31 aa, 3,3 kD; SEQ ID NO:8 (ID8<sub>sin</sub>, CM3) se corresponde con GLP-1(7-37)-IP-2, 46 aa, 5,1 kD; SEQ ID NO:7 (ID7<sub>rec</sub>, CM2) se corresponde con GLP-1(7-37)-IP-2-RR-GLP-2, 83 aa, 9,4 kD; SEQ ID NO:6 (ID6<sub>sin</sub>, CM1) se corresponde con GLP-1(7-37)-IP-2-RR-GLP-1(7-37), 79 aa, 8,7 kD.

#### Ejemplo 6: Estabilidad en plasma humano *in vitro* de los péptidos GLP-1<sup>CM</sup>

Se incubaron péptidos GLP-1 sintéticos (no según las reivindicaciones) (SEQ ID NO:1<sub>sin</sub>, SEQ ID NO:6<sub>sin</sub>, SEQ ID NO:7<sub>rec</sub>, SEQ ID NO:8<sub>sin</sub>) a unas concentraciones de 20 ng/ml con plasma humano a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 horas. Se inhibió la actividad dipeptidilpeptidasa del plasma mediante un inhibidor de DPP-IV (nº DPP4, Biotrend). El GLP activo se midió utilizando un ELISA de GLP-1 (activo) (nº EGLP-35K, Biotrend).

En contraste con el GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO:1), los péptidos de GLP-1 alargados en el C-terminal de la invención SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8 están significativamente estabilizados en el plasma humana

*in vitro* (figura 7). Como control (en el lado derecho) se muestran los resultados obtenidos para los experimentos con la adición de DPP-IV. La actividad GLP-1 se mantiene completamente en estos experimentos control.

### Ejemplo 7: Bioensayo *in vitro*

#### Producción de AMP cíclico

5 Se cultivaron células RIN-5F (tumor de células de islotes de rata; ECACC nº 95090402) en placas de 24 pocillos durante 4 días, alcanzando 70% de confluencia. Las células se lavaron dos veces con DMEM (E15-009, PAA) antes de la adición de 0,5 ml de DMEM (E15-009, PAA) suplementado con HSA al 1% (Aventis), IBMX 0,2 mM (858455, Sigma) y los péptidos de ensayo. Después de una incubación durante 20 minutos a 25 °C, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. Se extrajo el AMPc celular mediante la adición de HCl 0,1 N que contenía Triton X-100 al 0,5%. Se cuantificó el AMP cíclico utilizando EIA de AMPc (pH bajo) (nº de catálogo DE0355, R&D). Para la estimulación se utilizó  $3 \cdot 10^{-8}$  M de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:6<sub>sin</sub>, SEQ ID NO:6<sub>rec</sub>, SEQ ID NO:7<sub>rec</sub>, SEQ ID NO:8<sub>sin</sub> (no según las reivindicaciones).

10 Los resultados se muestran en la figura 8. Una producción del 100% de AMPc se corresponde con la producción basal en ausencia de GLP-1. El GLP-1 se une a receptores acoplados a proteína G y estimula la producción de AMPc. Todas las moléculas ensayadas aumentan la producción de AMPc celular.

### Ejemplo 8: Bioactividad *in vivo*

20 Se trataron ratones con diabetes de tipo II de 11 semanas (C57BL/Ks-Lepr<sup>db/db</sup>, Harlan) con 5 µg de péptido mediante una inyección subcutánea dos veces diarias a las 9 a.m. y 5 p.m. (n = 5 por grupo). Se midió la glucosa sanguínea antes (día 0) y después del tratamiento con péptidos de GLP<sup>CM</sup> (día 2, 4, 7, 10) a las 10 a.m. después de un periodo de ayuno durante la noche. Los datos se presentaron con relación a los niveles de glucosa sanguínea medidos en el día 0.

25 Todos los péptidos de fusión ensayados (SEQ ID NO:6 (sintético o recombinante) y SEQ ID NO:7 (sintético o recombinante)) (no según las reivindicaciones) tienen un efecto antihiper glucémico. Los mejores resultados se obtuvieron con SEQ ID NO:6 recombinante (CM1) y SEQ ID NO:8 sintético (CM3). En la figura 9 (eje de ordenadas) se muestra el efecto relativo del tratamiento. La glucosa sanguínea en el día = 0 se ajustó a 1. Los animales no tratados siguen presentando un aumento continuo en el nivel de glucosa sanguínea a lo largo del tiempo, mientras que los animales tratados con los péptidos de la invención muestran una disminución continua *grosso modo* del nivel de glucosa sanguínea a lo largo del tiempo.

### Ejemplo 9: Medición de la estabilidad en plasma *in vitro* de péptidos de GLP-1<sup>CM</sup> (método de ensayo cinético)

30 Se incubaron parte alícuotas de 1 µM de péptido en tampón de incubación (trietanolamina-HCl 50 mM (pH 7,8), HSA al 0,2%) de CM3, análogos de CM3 sustituidos con alanina (CM3-ANA01, CM3-ANA02, CM3-ANA03, CM3-ANA04), análogos de CM3 acortados en el C-terminal (CM3-ANA06, CM3-ANA07), o análogos CM3 alargados en el C-terminal (CM3-ANA09), con plasma humano al 10% a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 0, 3, 6 y 9 horas. La actividad dipeptidilpeptidasa se detuvo mediante la adición de un inhibidor de DPP-IV (nº DPP, Biotrend) y se determinaron los niveles de GLP-1 activo utilizando un ELISA de GLP-1 (activo) (nº EGLP-35K, Linco). Los resultados proceden de triplicados al menos de dos experimentos diferentes.

40 Los péptidos de fusión que tienen al menos nueve aminoácidos añadidos al C-terminal de GLP-1 son CM3 (murino, GLP-1(7-37)-IP-2) y sus derivados con secuencias modificadas en el componente (II) (IP-2), es decir, CM3, CM3-ANA01, CM3-ANA02, CM3-ANA03, CM3-ANA04, CM3-ANA05 y CM3-ANA07 (en la presente CM3, CM3-ANA02, CM3-ANA03, CM3-ANA04, CM3-ANA05 y CM3-ANA07 no son según las reivindicaciones). Los péptidos de GLP-1 y CM3-ANA06 reflejan sustancias control o de referencia.

45 La figura 10 muestra la porción activa del GLP-1 activo como un porcentaje del valor a las 0 h (0 h = 100%). Se observa claramente que el GLP-1 tiene la peor estabilidad en plasma, quedando sólo 9% después de 9 h de exposición al plasma. CM3-ANA01 muestra los mejores valores de estabilidad, quedando 84% del material después de 9 h. Los péptidos de fusión de la invención tienen un resto de al menos 30% después de 9 h, mientras que los péptidos con extensiones más cortas no alcanzan estos valores. A partir de la cinética puede determinarse un tiempo necesario para degradar el GLP-1 activo hasta 80% del valor a las 0 h (DT<sub>80</sub>: tiempo de degradación al 80%) para las sustancias ensayadas.

Secuencias listadas según valores crecientes de DT<sub>80</sub>:

péptido	secuencia	DT <sub>80</sub> [h]	Valor-9 h [%]
GLP-1	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRG	0,8	9
CM3-ANA06	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRGRDFE	0,9	11
CM3-ANA03	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRGRDAAAAVADAEELG	1,6	30
CM3-ANA07	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRGRDFEPEVA	2,0	37
CM3-ANA09	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRGRDFEPEVAADAEELGRRBAC	4,2	60
CM3	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRGRDFEPEVAADAEELG	4,4	63
CM3-ANA02	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRGRDFEPEVAADAEELG	4,5	65
CM3-ANA04	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRGAAADAAAAVADAAELG	4,7	65
CM3-ANA01	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRGAADEPEVAADAEELG	12,5	84

Los péptidos de fusión de la invención muestran una estabilidad en plasma *in vitro* considerablemente más larga, comparados con las sustancias de referencia. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, el alargamiento del C-terminal de GLP-1 introduce un impedimento estérico, evitando que estos análogos entren en el sitio activo de la DPP-IV, y así escapan a la degradación, mientras que sustancias de referencia más cortas no muestran este efecto protector de la estabilidad de GLP-1. Esta hipótesis se ve apoyada por la estabilidad continuamente creciente de los alargamiento en el C-terminal acumulados de los péptidos CM3-ANA06 (36 aa), CM3-ANA07 (40 aa) y CM3 (46 aa). No obstante, este fenómeno no depende sólo el número puro de aminoácidos, lo cual ha sido demostrado por las sustituciones de alanina en la región de IP-2 de CM3. El péptido CM3-ANA03, que tiene el mismo número de aminoácidos que CM3, tiene una estabilidad muy reducida comparado con CM3. Por otra parte, CM3-ANA01, que también tiene 46 aa, tiene una estabilidad en plasma mayor que CM3. Esto puede indicar que, además del número de aminoácidos, otros efectos estéricos pueden influir en la estabilidad. Se prefieren particularmente los péptidos de fusión que tienen un alargamiento que comprende IP-2 en el C-terminal de GLP-1, o un alargamiento que tiene un cierto grado de homología con IP-2, que puede ser el resultado de una conformación específica, que impide que la región N-terminal entre en el sitio activo de la DPP-IV.

#### Ejemplo 10: Estudio *in vivo* - Inmunogenicidad

Para aclarar la inmunogenicidad potencial de una sustancia de ensayo CM1, se realizó un estudio en ratones en Parabioscience (Groningen, Alemania). El ensayo se realizó con ratones BALB/c que recibieron 5 inyecciones repetidas (70 µg de péptido/dosis, por vía intravenosa) a lo largo de 22 d (n = 5).

CM1<sub>sin</sub> no indujo toxicidad y sólo una mínima respuesta de anticuerpos de células T y titulación de anticuerpos, tal como se muestra en la siguiente figura. No puede excluirse un efecto inmunológico de los subproductos (pureza del péptido sólo 95%). La figura 11 muestra estudios para la evaluación de los efectos inmunogénicos potenciales de CM1<sub>sin</sub>. A la izquierda (figura 11A) se muestran los resultados de un ensayo de respuesta de memoria de células T. Se explantaron los bazo de ratones tratados y control, se aislaron las células T y se estimularon con cantidades crecientes de antígeno. Se mide la respuesta de memoria proliferativa. A la derecha (figura 11B) se determina la titulación de anticuerpos IgG específicos de antígeno en el suero inmunológico de los animales.

#### Ejemplo 11: Estudio de eficacia de dosis en ratones diabéticos

Después de dos horas de ayuno se trataron ratones diabéticos C57BL/KsJ@Rj-db (db/db) con cinco concentraciones diferentes de GLP-1, CM1, CM3, CM3-ANA01 y exendina-4. Un sexto grupo se trató sólo con disolución salina. Se trataron 7 animales por grupo. Se determinó la glucosa sanguínea de sangrados de la cola directamente antes de la inyección, 1 hora y 4 horas después de la inyección.

Los resultados se muestran en curvas de dosis-respuesta según la figura 12 (figura 10A (GLP-1), figura 12B (CM1), fig. 12C (CM3) y figura 12D (CM3-ANA01)). Para cada sustancia de ensayo se preparó una gráfica con la diferencia de porcentaje de la glucosa sanguínea con relación al valor de inicio para las diferentes concentraciones. Se determinó el valor de ED<sub>50</sub> para las diferentes sustancias de ensayo preparando una curva de dosis-respuesta con los valores de las mediciones en 1 h como una reducción del porcentaje en comparación con el valor basal. Para evaluar el valor de ED<sub>50</sub> para GLP-1, CM3-ANA01, CM3<sub>rec</sub> y exendina-4, se utilizó el modelo de Morgan-Mercer-Flodin (MMF), y para CM1 se utilizó el modelo de Richards. Ambos modelos son modelos de ajuste sigmoidal para la evaluación de la respuesta a la dosis. Para cada péptido se determinaron los valores de ED<sub>50</sub> de glucosa plasmática (una sola dosis subcutánea en µg/ratón) a partir de la disminución del porcentaje de glucosa sanguínea. Se resumen en la tabla 1.

Tabla 1

Péptido	ED <sub>50</sub> [µg/ratón]
GLP-1 <sub>(7-37)</sub>	12,76
CM1	0,61
CM3	0,25
CM3-ANA01	0,55
exendina-4	0,03

5 Deducido a partir de los valores de ED<sub>50</sub>, los análogos de GLP-1 CM1, CM3 y CM3-ANA01 revelan una mejor bioactividad *in vivo* en más de 20 veces, que muy probablemente es el resultado de la estabilidad en plasma potenciada.

10 Todos los péptidos ensayados conduce a una disminución significativa en los niveles de glucosa sanguínea en ratones db/db hiperglucémicos al menos para las concentraciones mayores. La caída en la glucosa plasmática después de una única inyección subcutánea de 1,1-3,0 nmol de péptido (frente al control) se resume en la tabla 2. La tabla 2 muestra los efectos de disminución de glucosa de las sustancias de ensayo (frente al control). Se indica la caída en la glucosa plasmática y los correspondientes niveles de significancia para el periodo de tiempo de 1 hora (a 1 h) y 4 horas (a 4 h) después de la inyección del péptido. Se han observado diferencias en la eficacia a largo plazo de los péptidos. Sólo la exendina-4 y CM3 revelaron una disminución significativa de los niveles de glucosa sanguínea después de 4 horas.

Tabla 2

Péptido	Concentración	Caída en la glucosa plasmática	Valor p (ensayo de la t independiente)
GLP-1 <sub>(7-37)</sub>	3,0 nmol	15% ± 24% a 1 h	no significativo
	3,0 nmol	0% a 4 h	no significativo
CM1	1,1 nmol	50% ± 14% a 1 h	p < 0,0001
	1,1 nmol	0% a 4 h	no significativo
CM3	2,0 nmol	46% ± 6% a 1 h	p < 0,01
	2,0 nmol	21% ± 10% a 4 h	p < 0,05
CM3-ANA01	2,0 nmol	62% ± 12% a 1 h	p < 0,001
	2,0 nmol	18% ± 11% a 4 h	no significativo
exendina-4	2,4 nmol	32% ± 14% a 1 h	p < 0,01
	2,4 nmol	29% ± 9% a 4 h	p < 0,01

15

#### Ejemplo 12: Tratamiento a largo plazo de ratones db/db

Se investigaron cuatro grupos con n = 12 ratones C57BL/KsJ@Rj-db (db/db):

Grupo A: tratamiento con vehículo (disolución salina al 0,9%) una vez diaria

Grupo B: tratamiento con 24 nmol/kg de sustancia de ensayo 1: CM1rec una vez diaria

20 Grupo C: tratamiento con 24 nmol/kg de sustancia de ensayo 2: CM3-ANA01 una vez diaria

Grupo D: tratamiento con 24 nmol/kg de sustancia de ensayo exendina-4 (conocida en la técnica y aprobada, aunque la exendina-4 no es un análogo de GLP-1) una vez diaria

Los péptidos o el vehículo se administrarán una vez diaria (grupo A-D) entre 2:00-3:00 p.m. por vía subcutánea en el pliegue de piel de la espalda. El regimen continúa durante 18 semanas. Desde la semana 12 a la semana 18, el tratamiento se realiza dos veces diarias en 6 de 12 animales por grupo.

5 Se investigaron diversos parámetros de los ratones, es decir, estado de salud (1), peso corporal (2), consumo de alimento (3), glucosa sanguínea (4), ensayo de tolerancia a la glucosa (5), datos de insulina (6), hemoglobina glicosilada (7), patología (8), y reestimulación de células T (9).

Estado de salud (1): fue bueno en todos los grupos, no se observaron efectos secundarios del tratamiento.

10 Peso corporal (2): fue menor en todos los grupos tratados después de 18 semanas de tratamiento (figura 13). El aumento de peso corporal relativo fue significativamente menor en el grupo de CM3-ANA01. La figura 13A muestra el efecto de un tratamiento con disolución salina (A), CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D) sobre el peso corporal de ratones db/db. Se representan gráficamente los valores medios de 12 animales por grupo. La figura 13B muestra el efecto de un tratamiento con disolución salina (A), CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D) sobre el peso corporal de ratones db/db. Se representa gráficamente el aumento de peso relativo de 12 animales por grupo después de un tratamiento de 122 días. Sólo el tratamiento con la sustancia de ensayo CM3-ANA01 (grupo B) reveló un aumento de peso significativamente menor ( $p < 0,001$ ).

Consumo de alimento (3): fue significativamente menor en el grupo CM1 y CM3-ANA01 comparado con el control. La figura 14 muestra el efecto de un tratamiento con disolución salina (A), CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D) sobre el consumo de alimento semanal de ratones db/db durante un periodo de tratamiento de 122 días. El consumo de alimento relativo por ratón disminuye significativamente en el grupo B y C ( $p < 0,001$ ).

20 Niveles de glucosa sanguínea (4): se determinaron en una diversidad de situaciones. El nivel de glucosa sanguínea sin ayuno (1 hora después de la inyección del péptido) se muestra en la figura 15A, es decir, el efecto de un tratamiento con disolución salina (A), CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D) sobre los niveles de glucosa sanguínea sin ayuno. La glucosa sanguínea se midió en un sangrado de la cola 1 hora después de la inyección subcutánea de disolución salina (A) o los péptidos CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D) a una concentración de 24 nmol/kg. Comparado con el control, el nivel de glucosa sanguínea sin ayuno 1 h después de la inyección subcutánea del péptido se reduce al 55% en el grupo B, 51% en el grupo C, y 60% en el grupo D (figura 15B). La disminución de la glucosa sanguínea en los grupos tratados es muy significativa ( $p < 0,0001$ ).

30 En la figura 15C se muestra el nivel de glucosa sanguínea en ayunas (18 horas después de la inyección del péptido), es decir, el efecto de un tratamiento con disolución salina (A), CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D) sobre los niveles de glucosa sanguínea en ayunas. La glucosa sanguínea se midió en un sangrado de la cola después de un ayuno durante la noche de 12 horas, 18 horas después de la inyección subcutánea de las sustancias de ensayo. El nivel de glucosa sanguínea en ayunas 18 h después de la inyección del péptido se reduce en el grupo de CM1 y CM3-ANA01.

35 Ensayo de tolerancia a la glucosa (IPGTT) (5): se realizó (por vía intraperitoneal) después de 8 semanas de tratamiento en ratones de los grupos A-D. El valor de glucosa sanguínea basal (0 min) de los animales en ayunas durante 12 horas se determinó mediante un sangrado de la cola, seguido de una inyección subcutánea de la sustancia de ensayo y una inyección intraperitoneal de una disolución de glucosa al 20% (1 g de glucosa por kg). La glucosa sanguínea se determinó también a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección de glucosa. Se demostró una normalización significativa de la tolerancia a la glucosa en todos los grupos tratados (figura 16A).  
40 En la figura 16A se muestran los niveles absolutos de glucosa sanguínea durante un ensayo de tolerancia a la glucosa por vía intraperitoneal (IPGTT) después de 8 semanas de tratamiento con disolución salina (A), CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D) (valores medios de cada grupo ( $n = 12$ )).

45 En la figura 16B se ofrece otra presentación de los datos presentados por la figura 16A del ensayo de tolerancia a la glucosa sanguínea, los niveles relativos de glucosa sanguínea durante un ensayo de tolerancia a la glucosa por vía intraperitoneal (IPGTT) después de 8 semanas de tratamiento con disolución salina (A), CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D) normalizados sobre el nivel inicial de glucosa sanguínea (100%).

50 Niveles de insulina (6): se determinaron en ratones después de un periodo de ayuno durante la noche de 12 horas. Después de 18 semanas de tratamiento, todos los ratones de los grupos tratados produjeron significativamente más insulina que el control no tratado. La figura 17 presenta los datos para los niveles de insulina sérica en ratones después de 18 semanas de tratamiento con disolución salina al 0,9% (grupo A), péptido CM1 (grupo B), péptido CM3-ANA01 (grupo C) o exendina-4 (grupo D). Directamente después de la toma de muestras, las muestras sanguíneas se trataron con un cóctel de inhibidores de proteasas para evitar la degradación de la insulina. El suero se analizó para la insulina con un ELISA ultrasensible de insulina de ratón ( $n^{\circ}$  de catálogo EIA-3440, DRG). La significancia se determinó mediante un ensayo de la t de Student.

55 Hemoglobina glicosilada (7): se forma cuando el exceso de glucosa plasmática se une a la hemoglobina en los eritrocitos (RBC). Puesto que los RBC tienen una extensión de vida de 120 días, las mediciones de la hemoglobina glicosilada ofrecen una indicación a largo plazo del control de la glucosa y se consideran un mejor indicador que los

niveles de glucosa plasmática. Se recogió sangre completa del seno retroorbital y se analizó con un kit de ensayo de HbA1c enzimático (nº DZ121A, Diazyme) para determinar los niveles de hemoglobina glicosilada. Utilizando la hemoglobina como parámetro, se observó una reducción significativa en el aumento en todos los grupos tratados.

5 La figura 18A muestra el aumento relativo de la hemoglobina glicosilada (GHb) en muestras de sangre completa después de 6, 12 y 18 semanas de tratamiento con disolución salina (A), CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D). La figura 18B muestra el aumento relativo de la hemoglobina glicosilada (GHb) en muestras de sangre completa después de 18 semanas de tratamiento con disolución salina (A), CM1 (B), CM3-ANA01 (C) o exendina (D). Se indica el valor medio de todos los animales por grupo (n = 12). El aumento de los niveles de hemoglobina glicosilada de todos los grupos tratados es significativamente menor que el control.

10 Patología (8): se realizó la patología de los ratones tratados. La necropsia no reveló diferencias en los órganos de los grupos tratados comparado con el grupo A no tratado, excepto el volumen del páncreas. Se determinó el peso de páncreas y se descubrió que era significativamente mayor en todos los grupos tratados. La figura 19 presenta el peso del páncreas determinado en el día del escarificación de los animales después de 18 semanas de tratamiento con disolución salina al 0,9% (grupo A, n = 11), péptido CM1 (grupo B, n = 12), péptido CM3-ANA01 (grupo C, n = 12) o exendina-4 (grupo D, n = 12).

15 Inmunogenicidad de tipo IV (9): para evaluar los efectos inmunológicos potenciales de las sustancias ensayadas, se estudió la inmunogenicidad de tipo IV mediante la reestimulación de células T. Así, se explantó el bazo de 8 animales por grupo, se aislaron las células T y se reestimularon con diferentes concentraciones de las correspondientes sustancias de ensayo. Comparado con los controles no tratados, no se descubrió un aumento significativo en la proliferación de células T reestimuladas con péptidos. La figura 20 muestra la respuesta de memoria *in vitro* de las células del bazo a diferentes concentraciones de las sustancias de ensayo CM1 (figura 20a) y CM3-ANA01 (figura 20B) y la sustancia de referencia exendina-4 (figura 20C). Utilizando un ensayo de proliferación de células no radiactivo (ELISA de proliferación celular, BrdU, quimioluminiscente), se midió la respuesta de memoria *in vitro* de las células del bazo de los ratones del grupo A a D frente a diluciones en 3 veces de las sustancias de ensayo CM1 y CM3-ANA01 y la sustancia de referencia exendina-4, comenzando en 50 µg/ml, por triplicado en ratones individuales. Se calculó el índice de estimulación (SI) como el cociente de la respuesta en presencia del respectivo péptido y la respuesta en ausencia de péptidos. Se muestran los valores medios ± desviaciones estándar del respectivo grupo tratado y grupo control (grupo A; n = 3; grupo B: n = 6; grupo C: n = 7; grupo D: n = 6). Para el cálculo de los valores medios sólo se analizaron los ratones con un SI mayor que 6,5 en los cultivos de control positivo con Con A 5 µg/ml.

20 El estudio a largo plazo en ratones diabéticos apoya aún más la eficacia de los péptidos alargados en el C-terminal de la invención. En todos los parámetros ensayados (peso corporal, consumo de alimentos, niveles de glucosa sanguínea, hemoglobina glicosilada, tolerancia a la glucosa, secreción de insulina, peso del páncreas), los péptidos alargados en el C-terminal revelaron un significativo efecto terapéutico. Tomando en cuenta la homología de los péptidos de CellMed alargados en el C-terminal con la secuencia que aparece de modo endógeno, se demostró que estos péptidos de la invención son ventajosos en términos de inmunogenicidad, comparados con la exendina-4 que no es de mamífero. Los datos de un estudio de inmunogenicidad en ratones apoyan la ausencia de cualquier inmunogenicidad clínicamente importante del péptido CM1.

LISTADO DE SECUENCIAS

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLKGR G

SEQ ID NO:1

HADGSFSDEM NTILDNLAAR DFINWLIQTK ITDRK

5 SEQ ID NO:4

HADGSFSDEM STILDNLATR DFINWLIQTK ITDKK

SEQ ID NO:5

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLKGR GRRDFPEEVA IAEELGRRHA  
EGTFTSDVSS YLEGQAAKEF IAWLVKGRG

SEQ ID NO:6

10 HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLKGR GRRDFPEEVA IAEELGRRHA  
DGSFSDEMST ILDNLATRDF INWLIQTKIT DKK

SEQ ID NO:7

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLKGR GRRDFPEEVA IAEELG

SEQ ID NO:8

MAPAAWLRS AARALLPML LLLQPPPL ARALPPDVHH LHAERRGPQP  
WHAALPSSPA PAPTQEAPR PASSLRPPRC GVPDPSDGLS ARNRQKR

15 SEQ ID NO:9

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLKGR GRRDFPEEVA IVEELGRRHA  
EGTFTSDVSS YLEGQAAKEF IAWLVKGRG

SEQ ID NO:10

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLKGR GRRDFPEEVA IVEELGRRHA  
DGSFSDEMNT ILDNLAARDF INWLIQTKIT DRK

SEQ ID NO:11



1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg  
                   M A P A A W L R S A A A R A  
 51 cectgctgcc acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg  
           L L P P M L L L L L Q P P P L L  
 101 gcccgggccc tgccccggt gagtgcccc cactcgccgt ccgctcctcg  
       A R A L P P  
 151 ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc ccagcggcgt atccggacgc  
 201 caagaaacca gagagccagc cagatgcca aggccctgc catgtgccgg  
 251 tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgcac  
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta  
 351 ggcctgacca gaccctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct  
                                   D V H H L  
 401 gcacgccgag aggcgcggcc ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca  
       H A E R R G P Q P W H A A L P S S  
 451 gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg cccccaggcc tgcccagcagc  
       P A P A P A T Q E A P R P A S S  
 501 ctgagggccac ccaggtgccg cgtgcctgat ccctccgatg gcctgagcgc  
       L R P P R C G V P D P S D G L S A  
 551 tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga  
       R N R Q K R H A E G T F T S D V S  
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg  
       S Y L E G Q A A K E F I A W L V  
 651 aagggcaggg gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga  
       K G R G R R D F P E E V A I V E E  
 701 gctgggccgg cgacacgccg agggcacctt cacctccgac gtgagcagct  
       L G R R H A E G T F T S D V S S Y  
 751 acctggaggg ccaggccgcc aaggagttca tcgcctggct ggtgaagggc  
       L E G Q A A K E F I A W L V K G  
 801 aggggctgag cgcgc  
       R G \*

SEQ ID NO:13

1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg cectgctgcc  
 61 acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gcccgggccc tgccccggt  
 121 gagtgcccc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggetgggc  
 181 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcca aggccctgc  
 241 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgcac  
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca  
 361 gaccctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc  
 421 ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg  
 481 cccccaggcc tgcccagcagc ctgagggcac ccaggtgccc cgtgcctgat ccctccgatg  
 541 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga  
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg  
 661 gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggccgg cgacacgccg  
 721 agggcacctt cacctccgac gtgagcagct acctggaggg ccaggccgcc aaggagttca  
 781 tcgcctggct ggtgaagggc aggggctgag cgcgc

SEQ ID NO:14

1 gatataccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg  
                   M A P A A W L R S A A A R A  
 51 ccctgctgcc acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg  
           L L P P M L L L L L Q P P P L L  
 101 gccggggccc tgcccccggt gagtgcccc cactcgccgt ccgctcctcg  
           A R A L P P  
 151 ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc ccagcggcgt atccggacgc  
 201 caagaaacca gagagccagc cagatgcca aggccctgc catgtgccgg  
 251 tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac  
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta  
 351 ggcctgacca gaccctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct  
                                           D V H H L  
 401 gcacgccgag aggcgcggcc ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaaagca  
           H A E R R G P Q P W H A A L P S S  
 451 gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg cccccaggcc tgccagcagc  
           P A P A P A T Q E A P R P A S S  
 501 ctgaggccac ccaggtgctg cgtgcctgat ccctccgatg gcctgagcgc  
           L R P P R C G V P D P S D G L S A  
 551 tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga  
           R N R Q K R H A E G T F T S D V S  
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg  
           S Y L E G Q A A K E F I A W L V  
 651 aagggcaggg gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga  
           K G R G R R D F P E E V A I V E E  
 701 gctgggcccg cgacacgccg acggcagctt cagcgacgag atgaacacca  
           L G R R H A D G S F S D E M N T I  
 751 tcctggacaa cctggcccgc cgcgacttca tcaactggct gatccagacc  
           L D N L A A R D F I N W L I Q T  
 801 aagatcaccg atcgggaagt agcgcgctga tatc  
           K I T D R K \*

SEQ ID NO:15

1 gatataccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg ccctgctgcc  
 61 acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gccggggccc tgcccccggt  
 121 gagtgcccc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc  
 181 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcca aggccctgc  
 241 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac  
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca  
 361 gaccctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc  
 421 ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg  
 481 cccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgctg cgtgcctgat ccctccgatg  
 541 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga  
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg  
 661 gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggcccg cgacacgccg  
 721 acggcagctt cagcgacgag atgaacacca tcctggacaa cctggcccgc cgcgacttca  
 781 tcaactggct gatccagacc aagatcaccg atcgggaagt agcgcgctga tatc

SEQ ID NO:16

1 gatataccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg  
                   M A P A A W L R S A A A R A  
 51 ccctgctgcc acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg  
           L L P P M L L L L L Q P P P L L

101 gcccgggccc tgccccggt gaggccccgc cactcgccgt ccgctcctcg  
 A R A L P P  
 151 ctgagggggc gccgggcaag cgggctgggc ccagcggcgt atccggacgc  
 201 caagaaacca gagagccagc cagatgcca aaggccctgc catgtgccgg  
 251 tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgca  
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta  
 351 ggcctgacca gacctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct  
 D V H H L  
 401 gcacgccgag aggcgcggcc ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca  
 H A E R R G P Q P W H A A L P S S  
 451 gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg cccccaggcc tgccagcagc  
 P A P A P A T Q E A P R P A S S  
 501 ctgagggccac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg gcctgagcgc  
 L R P P R C G V P D P S D G L S A  
 551 tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga  
 R N R Q K R H A E G T F T S D V S  
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg  
 S Y L E G Q A A K E F I A W L V  
 651 aagggcaggg gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga  
 K G R G R R D F P E E V A I V E E  
 701 gctgggccgg cgacacgccg acggcagctt cagcgacgag atgaacacca  
 L G R R H A D G S F S D E M N T I  
 751 tcttgacaaa cctggcccgcg cgtga tat c  
 L D N L A A R \*

SEQ ID NO:17

1 gatateccacc atggcccccg ccgctggct gaggagcgc gccgccaggg ccctgctgcc  
 61 acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc accctgctg gccggggccc tgccccggt  
 121 gaggccccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcaag cgggctgggc  
 181 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcca aaggccctgc  
 241 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgca  
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca  
 361 gacctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc  
 421 ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg  
 481 cccccaggcc tgccagcagc ctgagggccac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg  
 541 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga  
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg  
 721 acggcagctt cagcgacgag atgaacacca tcttgacaaa cctggcccgcg cgtgatatac

SEQ ID NO:18

1 gatateccacc atggcccccg ccgctggct gaggagcgc gccgccaggg  
 M A P A A W L R S A A A R A  
 51 ccctgctgcc acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc accctgctg  
 L L P P M L L L L Q P P P L L  
 101 gccggggccc tgccccggt gaggccccgc cactcgccgt ccgctcctcg  
 A R A L P P  
 151 ctgagggggc gccgggcaag cgggctgggc ccagcggcgt atccggacgc  
 201 caagaaacca gagagccagc cagatgcca aaggccctgc catgtgccgg  
 251 tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgca  
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta  
 351 ggcctgacca gacctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct  
 D V H H L

401 gcacgccgag aggcgcggcc ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca  
 H A E R R G P Q P W H A A L P S S  
 451 gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg cccccaggcc tgccagcagc  
 P A P A P A T Q E A P R P A S S  
 501 ctgaggccac ccaggtgegg cgtgcctgat ccctccgatg gcctgagcgc  
 L R P P R C G V P D P S D G L S A  
 551 tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga  
 R N R Q K R H A E G T F T S D V S  
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg  
 S Y L E G Q A A K E F I A W L V  
 651 aagggcaggg gccgcagggg cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga  
 K G R G R R D F P E E V A I V E E  
 701 gctgggctga gcgcgc  
 L G \*

SEQ ID NO:19

1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgc gccgccaggg ccctgctgcc  
 61 acccatgctg ctgctgctgc tgcagccccc acctctgctg gccccggccc tgcccccggt  
 121 gagtgccgc cactgcgcgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcaeg cgggctgggc  
 181 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc  
 241 catgtgcccg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgca  
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca  
 361 gaccctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc  
 421 ctcagccctg gcacgcgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg  
 481 cccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgccc cgtgcctgat ccctccgatg  
 541 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga  
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg  
 661 gccgcagggg cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggctga gcgcgc

SEQ ID NO:20

5 HEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR G

SEQ ID NO:21

**Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala**

SEQ ID NO:25

**Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile**

10 SEQ ID NO:26

**Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu**

SEQ ID NO:27

**Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu**

SEQ ID NO:28

15

**Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly**

SEQ ID NO:29

**Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly**

SEQ ID NO:30

**His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ala  
Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly**

SEQ ID NO:31

5 **His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg  
Arg Asp Phe Ala Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly**

SEQ ID NO:38

**His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg  
Arg Asp Phe Ala Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly**

SEQ ID NO:43 (fórmula (I))

**Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa  
Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**

10 SEQ ID NO:44 (fórmula (II))

**Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Xaa Tyr Leu Glu Xaa  
Xaa Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Val Xaa Xaa Xaa Xaa**

SEQ ID NO:45 (fórmula (III))

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biocompatibles UK Limited

<120> Péptidos de fusión de GLP-1, su producción y su uso

5

<130> BI07P001WO

<140>

<141>

10

<150> documento EP050207.18.2

<151> 22 de septiembre de 2005

<160> 45

15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 31

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: péptido sintético que se corresponde con GLP-1(7-37) (véase la descripción)

25

<400> 1

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> 2

30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

# ES 2 394 218 T3

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de IP-2 de longitud completa que tiene todos los 15 aminoácidos de la secuencia de IP-2 natural, humano (véase la descripción)

<400> 2

5

**Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly**  
**1 5 10 15**

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de IP-2 de longitud completa que tiene todos los 15 aminoácidos de la secuencia de IP-2 natural, murino (véase la descripción)

15

<400> 3

**Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly**  
**1 5 10 15**

20

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia: isoforma murina de GLP-2 (véase la descripción)

<400> 4

30

**His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn**  
**1 5 10 15**

**Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr**  
**20 25 30**

**Asp Arg Lys**  
**35**

<210> 5

ES 2 394 218 T3

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia: isoforma humana de GLP-2 (véase la descripción)

<400> 5

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Ser Thr Ile Leu Asp Asn  
1 5 10 15

Leu Ala Thr Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr  
20 25 30

Asp Lys Lys  
35

10

<210> 6

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO:6 (ID6sin, CM1) se corresponde con GLP-1(7-37)-IP-2-RR-GLP-1(7-37), 79 aa, 8,7 kD (véase la descripción)

20

<400> 6

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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly Arg Arg  
35 40 45

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
50 55 60

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
65 70 75

<210> 7

25

<211> 83



ES 2 394 218 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO:7 (ID7rec, CM2) se corresponde con GLP-1(7-37)-IP-2-RR-GLP-2, 83 aa, 9,4 kD (véase la descripción)

<400> 7

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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly Arg Arg  
35 40 45

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Ser Thr Ile Leu Asp Asn  
50 55 60

Leu Ala Thr Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr  
65 70 75 80

Asp Lys Lys

10

<210> 8

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO:8 (ID8sin, CM3) se corresponde con GLP-1(7-37)-IP-2, 46 aa, 5,1 kD

20

<400> 8

ES 2 394 218 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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly  
35 40 45

<210> 9

<211> 97

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: artificial

10 <400> 9

Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg Ala Leu Leu  
1 5 10 15

Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu Leu Ala Arg  
20 25 30

Ala Leu Pro Pro Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro  
35 40 45

Gln Pro Trp His Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala  
50 55 60

Thr Gln Glu Ala Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys  
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys  
85 90 95

Arg

<210> 10

<211> 79

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO:10 (N-GLP-1(7-37)-IP-2(humano)-RR-GLP-1(7-37)-C, también

ES 2 394 218 T3

denominado CM1 humano) (véase la descripción)

<400> 10

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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg  
35 40 45

5 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
50 55 60

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
65 70 75

<210> 11

<211> 83

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO:11 (N-GLP-1(7-37)-IP-2(humano)-RR-GLP-2-C, también denominado CM2 humano en la presente) (véase la descripción)

<400> 11

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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg  
35 40 45

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn  
50 55 60

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr  
65 70 75 80

Asp Arg Lys

20 <210> 12

ES 2 394 218 T3

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia: SEQ ID NO:12 GLP-1(7-37) unido sin ninguna secuencia conectora a través de su C-terminal a IP-2 humano (véase la descripción)

<400> 12

10

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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly  
35 40 45

<210> 13

<211> 815

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia: (SEQ ID NO:13) representa la secuencia del péptido traducido de la construcción según la figura 1k (SEQ ID NO:14) (véase la descripción)

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(118)

25

<220>

<221> CDS

<222> (387)..(809)

30 <400> 13

```

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg      49
          Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
          1                    5                    10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg      97
Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
    15                    20                    25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactgcc gtccgctcct      148
Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
    30                    35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gcccagcggc gtatccggac gccaaagaac      208

cagagagcca gccagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt cctctccat      268

ttgccctgcc acacagtggg ctgggggtgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta      328

actgtggggc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttctct cttcccag      386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc gcc cct cag ccc tgg cac      434
Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
    40                    45                    50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc      482
Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
    55                    60                    65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc gcc gtg cct gat      530
Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
    70                    75                    80

ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag      578
Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
    85                    90                    95                    100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc      626
Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
    105                    110                    115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc cgc agg gac ttc      674
Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
    120                    125                    130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg ggc cgg cga cac gcc gag      722
Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg His Ala Glu
    135                    140                    145

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc      770
Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
    150                    155                    160

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc tga gcgcgc      815
Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
    165                    170                    175

```

<210> 14

5 <211> 815

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN de la construcción según la figura 1k (véase la descripción)

5 <400> 14

```

gatatccacc atggccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg ccctgctgcc      60
accatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gccggggccc tgccccggg      120
gagtgcccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc      180
ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgccaaggggccctgc      240
catgtgccgg tgcctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac      300

gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca      360
gacctcatg tcttctect tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc      420
ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg      480
ccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtcggc cgtgcctgat ccctccgatg      540
gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggc caccttcacc tccgacgtga      600
gcagctacct ggagggccag gccgcccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg      660
gccgcagggc cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggcccg cgacacgccg      720
agggcacctt cacctccgac gtgagcagct acctggaggg ccaggccgcc aaggagtcca      780
tcgcctggct ggtgaagggc aggggctgag cgcgc      815
    
```

<210> 15

10 <211> 834

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN y secuencia del péptido traducido según la construcción de la figura 1h (véase la descripción)

<220>

<221> CDS

20 <222> (11)..(118)

<220>

<221> CDS

<222> (387)..(821)

<400> 15

```

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg          49
      Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
      1          5          10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg      97
Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
  15          20          25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactcggc gtccgctcct      148
Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
  30          35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gccccagcggc gtatccggac gccaaagaaac      208

cagagagcca gccagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt ccctctccat      268

ttgccctgcc acacagtggg ctggggttgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta      328

actgtgggcc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttcctc cttcccag      386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc ggc cct cag ccc tgg cac      434
Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
  40          45          50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc      482
Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
  55          60          65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc ggc gtg cct gat      530
Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
  70          75          80

ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag      578
Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
  85          90          95          100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc      626
Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
  105          110          115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc cgc agg gac ttc      674
Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
  120          125          130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg ggc cgg cga cac gcc gac      722
Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg His Ala Asp
  135          140          145

ggc agc ttc agc gac gag atg aac acc atc ctg gac aac ctg gcc gcg      770
Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Ala
  150          155          160

cgc gac ttc atc aac tgg ctg atc cag acc aag atc acc gat cgg aag      818
Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr Asp Arg Lys
  165          170          175          180

tga gcgcgctgat atc          834
  
```

<210> 16  
 <211> 834  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN de la construcción según la figura 1h (véase la descripción)

<400> 16

10

```

gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg ccctgctgcc      60
acctatgctg ctgctgctgc tgcagccccc acctctgctg gcccgggccc tgcccccggt      120
gagtgcccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc      180
ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcca agggccctgc      240
catgtgccgg tgccctttcc ctctcattt gccctgccac acagtgggct ggggttgcac      300
gtgtgtttgc tgacaggcca catcttaac tgtgggcat gtggacctta ggccctgacca      360
gacctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccact gcacgccgag aggcgcggcc      420
ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgccc tgccccagcc acccaggagg      480
ccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg      540
gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagagge acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga      600
gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg      660
gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggccgg cgacacgccg      720
acggcagctt cagcgacgag atgaacacca tcctggacaa cctggccgcg cgcgacttca      780
tcaactggct gatccagacc aagatcaccg atcggaagtg agcgcgctga tatc          834
    
```

<210> 17  
 <211> 780  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN y secuencia del péptido traducido de la construcción según la figura 1l (véase la descripción)

20

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (11)..(118)



<220>

<221> CDS

<222> (387)..(776)

5

<400> 17

```

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg      49
          Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
          1                    5                    10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg      97
Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
    15                    20                    25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactgcc gtccgctcct      148
Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
    30                    35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gcccagcggc gtatccggac gccaaagaaac      208

cagagagcca gccagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt cctctccat      268

ttgccctgcc acacagtggg ctgggggtgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta      328

actgtgggcc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttctc ctccccag      386
    
```

ES 2 394 218 T3

gac	gtg	cac	cac	ctg	cac	gcc	gag	agg	cgc	ggc	cct	cag	ccc	tgg	cac	434
Asp	Val	His	His	Leu	His	Ala	Glu	Arg	Arg	Gly	Pro	Gln	Pro	Trp	His	
			40					45					50			
gcc	gcc	ctg	cca	agc	agc	cct	gcc	cct	gcc	cca	gcc	acc	cag	gag	gcc	482
Ala	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Thr	Gln	Glu	Ala	
		55					60					65				
ccc	agg	cct	gcc	agc	agc	ctg	agg	cca	ccc	agg	tgc	ggc	gtg	cct	gat	530
Pro	Arg	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	Pro	Arg	Cys	Gly	Val	Pro	Asp	
	70					75					80					
ccc	tcc	gat	ggc	ctg	agc	gct	cgg	aat	cgg	cag	aag	agg	cac	gcc	gag	578
Pro	Ser	Asp	Gly	Leu	Ser	Ala	Arg	Asn	Arg	Gln	Lys	Arg	His	Ala	Glu	
85				90					95						100	
ggc	acc	ttc	acc	tcc	gac	gtg	agc	agc	tac	ctg	gag	ggc	cag	gcc	gcc	626
Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gln	Ala	Ala	
				105					110					115		
aag	gag	ttc	atc	gcc	tgg	ctg	gtg	aag	ggc	agg	ggc	cgc	agg	gac	ttc	674
Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	Arg	Arg	Asp	Phe	
			120					125					130			
cct	gag	gag	gtg	gcc	atc	gtg	gag	gag	ctg	ggc	cgg	cga	cac	gcc	gac	722
Pro	Glu	Glu	Val	Ala	Ile	Val	Glu	Glu	Leu	Gly	Arg	Arg	His	Ala	Asp	
		135					140					145				
ggc	agc	ttc	agc	gac	gag	atg	aac	acc	atc	ctg	gac	aac	ctg	gcc	gcg	770
Gly	Ser	Phe	Ser	Asp	Glu	Met	Asn	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Leu	Ala	Ala	
	150					155					160					
cgc	tga	tatc														780
Arg																
165																

<210> 18

<211> 720

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN de la construcción según la figura 11 (véase la descripción)

10

<400> 18

ES 2 394 218 T3

```

gatataccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgc gccgccaggg ccctgctgcc      60
accatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gccggggccc tgccccgggt      120
gagtgcccg cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc      180
ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc      240
catgtgccgg tgccctttcc ctctcattt gccctgccac acagtgggct ggggttgcac      300
gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca      360
gacctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccact gcacgccgag aggcgaggcc      420
ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgccc tgccccagcc acccaggagg      480
ccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgagg cgtgcctgat ccctccgat      540
gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga      600
gcagctacct ggagggccag gccccaagg agttcatcgc ctggctggtg aaggcaggg      660
acggcagctt cagcagcag atgaacacca tcctggacaa cctggccgcg cgctgatatc      720

```

<210> 19

5 <211> 716

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN y secuencia del péptido traducido según la figura 1m (véase la descripción)

<220>

<221> CDS

15 <222> (11)..(118)

<220>

<221> CDS

<222> (387)..(710)

20

<400> 19

ES 2 394 218 T3

gatataccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg 49  
Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg  
1 5 10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg 97  
Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu  
15 20 25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactcgcc gtccgctcct 148  
Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro  
30 35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gccagcggc gtatccggac gccaagaaac 208

cagagagcca gccagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt ccctctccat 268

ttgccctgcc acacagtggg ctgggggttg acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta 328

actgtggggc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttcctc cttcccag 386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc ggc cct cag ccc tgg cac 434  
Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His  
40 45 50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc 482  
Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala  
55 60 65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc ggc gtg cct gat 530  
Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp  
70 75 80

ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag 578  
Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu  
85 90 95 100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc 626  
Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala  
105 110 115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc cgc agg gac ttc 674  
Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe  
120 125 130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg ggc tga gcgcgc 716  
Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly  
135 140

<210> 20

5 <211> 716

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN de la construcción según la figura 1m (véase la descripción)

<400> 20

ES 2 394 218 T3

gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg ccctgctgcc 60  
 acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gcccgggccc tgcccccggt 120  
 gagtgcccg cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc 180  
 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc 240  
 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac 300  
 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca 360  
 gaccctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc 420  
 cttagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg 480  
 cccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgagg cgtgcctgat ccctccgatg 540  
 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgagg caccttcacc tccgacgtga 600  
 gcagctacct ggagggccag gccccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg 660  
 gccgcagggg cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggctga gcgcgc 716

<210> 21

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: artificial (véase la descripción)

10 <400> 21

His Gly 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> 22

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: artificial (véase la descripción)

20

<400> 22

Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile  
 1 5 10

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: artificial (véase la descripción)

10 <400> 23

Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu  
 1 5 10

<210> 24

<211> 14

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: artificial (véase la descripción)

20 <400> 24

Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu  
 1 5 10

<210> 25

25 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia: secuencia parcial derivada de IP-2

<400> 25

**Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala**  
**1 5**

<210> 26

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de SEQ ID NO:22, en la que las primeras dos alaninas han sido reemplazadas por dos argininas

<400> 26

**Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile**  
**1 5 10**

15 <210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de SEQ ID NO:23, en la que las primeras dos alaninas han sido reemplazadas por dos argininas

<400> 27

25

**Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu**  
**1 5 10**

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de SEQ ID NO:24, en la que las primeras dos alaninas han sido reemplazadas por dos argininas

35

<400> 28

**Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu**  
**1 5 10**

<210> 29

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de SEQ ID NO:2, en la que las primeras dos argininas han sido reemplazadas por dos alaninas

<400> 29

15 **Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly**  
**1 5 10 15**

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de SEQ ID NO:3, en la que las primeras dos argininas han sido reemplazadas por dos alaninas

<400> 30

**Ala Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly**  
**1 5 10 15**

30 <210> 31

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>



ES 2 394 218 T3

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (murino)

<400> 31

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 Ala  
20 25 30

5 Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly  
35 40 45

<210> 32

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (murino)

<400> 32

15

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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Ala Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly  
35 40 45

<210> 33

<211> 46

<212> PRT

20

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (murino)

25

<400> 33

ES 2 394 218 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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Ala Ala Ala Ala Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly  
35 40 45

<210> 34

<211> 46

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (murino)

10 <400> 34

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 Ala  
20 25 30

Ala Asp Ala Ala Ala Ala Val Ala Ile Ala Ala Ala Leu Gly  
35 40 45

<210> 35

<211> 36

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (murino)

20 <400> 35

ES 2 394 218 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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro  
35

<210> 36

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (murino)

10 <400> 36

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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala  
35 40

<210> 37

<211> 51

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (murino)

20

<400> 37

ES 2 394 218 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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly Arg Arg  
35 40 45

His Ala Cys  
50

<210> 38

<211> 46

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (humano)

10 <400> 38

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 Ala  
20 25 30

Ala Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly  
35 40 45

<210> 39

<211> 46

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (humano)

20

<400> 39

ES 2 394 218 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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Ala Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly  
35 40 45

<210> 40

<211> 46

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (humano)

10 <400> 40

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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Ala Ala Ala Ala Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly  
35 40 45

<210> 41

<211> 46

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (humano)

20

<400> 41

ES 2 394 218 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 Ala  
20 25 30

Ala Asp Ala Ala Ala Ala Val Ala Ile Val Ala Ala Leu Gly  
35 40 45

<210> 42

<211> 51

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia derivada de un fragmento de GLP-1-IP-2 (humano)

10 <400> 42

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 Arg  
20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg  
35 40 45

His Ala Cys  
50

<210> 43

15 <211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia: secuencia según la fórmula (I) (véase la descripción)

<220>

<221> característica\_misc

<222> (31)..(31)

25 <223> Xaa = NH<sub>2</sub>, cuando la secuencia es GLP-1(7-36)amida, o Xaa = Gly-OH, cuando la secuencia es GLP-1(7-37)amida

<400> 43

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 Xaa  
 20 25 30

5 <210> 44

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia según la fórmula (II) (véase la descripción)

<220>

<221> característica\_misc

15 <222> (1)..(1)

<223> Xaa es L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, 3-hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina

<220>

20 <221> característica\_misc

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, o Aib

<220>

25 <221> característica\_misc

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es, como alternativa, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico

30

<220>

<221> característica\_misc

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es Val o Leu; Xaa es Ser, Lys o Arg

35

<220>

<221> característica\_misc

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Ser, Lys o Arg

5

<220>

<221> característica\_misc

<222> (13)..(13)

<223> Xaa es Tyr o Gln

10

<220>

<221> característica\_misc

<222> (14)..(14)

<223> Xaa es Leu o Met

15

<220>

<221> característica\_misc

<222> (16)..(16)

<223> Xaa es Gly, Glu o Aib

20

<220>

<221> característica\_misc

<222> (17)..(17)

<223> Xaa es Gln, Glu, Lys o Arg

25

<220>

<221> característica\_misc

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es Ala o Val

30

<220>

<221> característica\_misc

<222> (20)..(20)

<223> Xaa es Lys, Glu o Arg

35

<220>



<221> característica\_misc

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es Glu o Leu

5 <220>

<221> característica\_misc

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es Ala, Glu o Arg

10 <220>

<221> característica\_misc

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es Val o Lys

15 <220>

<221> característica\_misc

<222> (28)..(28)

<223> Xaa es Lys, Glu, Asn o Arg

20 <220>

<221> característica\_misc

<222> (29)..(29)

<223> Xaa es Gly o Aib

25 <220>

<221> característica\_misc

<222> (30)..(30)

<223> Xaa es Arg, Gly o Lys o amida o está ausente

30 <220>

<221> característica\_misc

<222> (31)..(31)

<223> Xaa es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente

35 <400> 44

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Ala xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

<210> 45

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia según la fórmula (III) (véase la descripción)

10 <220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina

15

<220>

<221> característica\_misc

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, o Aib

20

<220>

<221> característica\_misc

<222> (2)..(2)

25

<223> Xaa es, como alternativa, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico

<220>

<221> característica\_misc

30

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys o Aib

<220>

<221> característica\_misc

35

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es, como alternativa, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico

5 <220>

<221> característica\_misc

<222> (16)..(16)

<223> Xaa es Gly, Glu o Aib

10 <220>

<221> característica\_misc

<222> (17)..(17)

<223> Xaa es Gln, Glu, Lys o Arg

15 <220>

<221> característica\_misc

<222> (20)..(20)

<223> Xaa es Lys, Glu o Arg

20 <220>

<221> característica\_misc

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es Ala, Glu o Arg

25 <220>

<221> característica\_misc

<222> (28)..(28)

<223> Xaa es Lys, Glu o Arg

30 <220>

<221> característica\_misc

<222> (29)..(29)

<223> Xaa es Gly o Aib

35 <220>

<221> característica\_misc

<222> (30)..(30)

<223> Xaa es Arg o Lys, amida o está ausente

<220>

<221> característica\_misc

5 <222> (31)..(31)

<223> Xaa es Gly, Ala, Glu o Lys, amida o está ausente

<400> 45

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Xaa Tyr Leu Glu Xaa  
1 5 10 15

Xaa Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Val Xaa Xaa Xaa Xaa  
20 25 30

10

## REIVINDICACIONES

1.- Un péptido de fusión que comprende, como componente (I), una secuencia N-terminal según:

(i) la fórmula II

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

en la que Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, 3-hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico, en el que Gly es particularmente preferido; Xaa16 es Val o Leu; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa19 es Tyr o Gln; Xaa20 es Leu o Met; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa25 es Ala o Val; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa27 es Glu o Leu; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa33 es Val o Lys; Xaa34 es Lys, Glu, Asn o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg, Gly o Lys o amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente; o

(ii) la fórmula III

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa18-Tyr-Leu-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

en la que Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-aminohistidina, hidroxihistidina, homohistidina, N-acetilhistidina, a-fluorometilhistidina, a-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa34 es Lys, Glu o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg o Lys, amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu o Lys, amida o está ausente; o

(iii) GLP-1(7-37) de SEQ ID NO:1 o una secuencia funcional que ejerce los efectos biológicos de GLP-1 como hormona incretina, su acción antiapoptótica o sus propiedades neutróficas y que tiene una coincidencia de secuencia de al menos 80% con GLP-1(7-37);

y como componente (II) una secuencia peptídica en el C-terminal de al menos 9 aminoácidos, y que contiene una secuencia según SEQ ID NO:26 (AADFP EEVAI) o una secuencia que tiene una coincidencia de secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO:26, que otorga una mayor resistencia frente a la inactivación por DPP-IV del péptido de fusión; o

un péptido de fusión que comprende los componente (I) y (II) según se definió anteriormente, en el que al menos uno de los aminoácidos está derivatizado mediante una modificación del esqueleto peptídico, en el que la modificación del esqueleto peptídico produce un mimético de andamiaje, cuyo esqueleto es diferente del esqueleto natural, y cuyas cadenas laterales son idénticas al péptido de fusión no modificado; o

un péptido de fusión que comprende los componentes (I) y (II) según se definió anteriormente, en el que se proporciona un isómero retro-inverso del péptido de fusión.

2.- El péptido de fusión según la reivindicación 1 que comprende, como componente (I) en el N-terminal, una secuencia GLP-1(7-35, 7-36 o 7-37), y como componente (II) una secuencia peptídica en el C-terminal de al menos 9 aminoácidos, y que contiene una secuencia según SEQ ID NO:26 (AADFP EEVAI), que otorga una mayor resistencia frente a la inactivación por DPP-IV del péptido de fusión.

3.- Un péptido de fusión según la reivindicación 2, en el que el componente (I) contiene una secuencia que tiene una coincidencia de secuencia de al menos 80% con SEQ ID NO:1.

4.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 3, en el que el componente (II) tiene un motivo de secuencia N-terminal seleccionado del grupo que consiste en XA o AX, en el que X es un aminoácido natural o un aminoácido no natural modificado.

5.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 4, en el que el componente (II) es una secuencia peptídica que contiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 (AADFP EEVAIVEEL) y SEQ ID NO:28 (AADFP EEVAIAEEL), o una secuencia que tiene una coincidencia de secuencia de al menos 80% con cualquiera de SEQ ID NO:27 o 28.

6.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 5, en el que el componente (II) es una secuencia peptídica que contiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29

- (AADFP EEVAIVEELG) y SEQ ID NO:30 (AADFP EEVAIAEELG), o una secuencia que tiene una coincidencia de secuencia de al menos 80% con cualquiera de SEQ ID NO:29 o 30.
- 5 7.- Un péptido de fusión según la reivindicación 6, en el que el componente (II) es una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30, o una secuencia que tiene una coincidencia de secuencia de al menos 80% con SEQ ID NO:29 o 30.
- 8.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 7, en el que el componente (II) es una secuencia peptídica que de 9 a 30, preferiblemente de 9 a 20, y lo más preferiblemente de 9 a 15 aminoácidos.
- 10 9.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 8, en el que el componente (I) y el componente (II) están unidos directamente o están unidos a través de una secuencia conectora.
- 10.- Un péptido de fusión según la reivindicación 9, en el que la secuencia conectora tiene una longitud de 1 a 10 aminoácidos.
- 15 11.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el péptido de fusión contiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:31 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRGAADFPEEVAIAEELG) y SEQ ID NO:38 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRGAADFPEEVAIVEELG).
- 12.- Un péptido de fusión según la reivindicación 11, en el que el péptido de fusión consiste en la SEQ ID NO:31 o consiste en la SEQ ID NO:38.
- 20 13.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 12, en el que el péptido de fusión contiene otro componente (III) unido al C-terminal del componente (II) y/o al N-terminal del componente (I).
- 14.- Un péptido de fusión según la reivindicación 13, en el que el componente (III) comprende al menos cuatro restos aminoácidos, preferiblemente al menos 10 restos aminoácidos adicionales, y lo más preferiblemente al menos 20, o al menos 30.
- 25 15.- Un péptido de fusión según la reivindicación 13 o 14, en el que el componente (III) comprende al menos 4, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20 restos aminoácido adicionales de la secuencia N-terminal de GLP-2 como en el proglucagón o de GLP-1(7-37).
- 16.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el componente (III) contiene la secuencia de SEQ ID NO:4 o 5, o una secuencia que tiene una coincidencia de secuencia de al menos 80% con SEQ ID NO:4 o 5.
- 30 17.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 16, en el que al menos uno de los aminoácidos está derivatizado con una modificación covalente de una cadena lateral de un aminoácido natural, o con una modificación de los grupos NH<sub>2</sub>- o carboxi-terminales.
- 18.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 17, en el que al menos uno de los aminoácidos está derivatizado con un grupo lipilo o carbohidrato.
- 35 19.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 18, en el que el resto His N-terminal de GLP-1 (GLP-1(7)) está químicamente modificado en su NH<sub>2</sub>-terminal y/o en su cadena lateral de histidilo, en particular, con un resto hidrófobo.
- 20.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 19, en el que el péptido de fusión comprende una proteína transportadora, en particular transferrina o albúmina, como componente (IV).
- 40 21.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 20, en el que la secuencia de aminoácidos de los componentes (I), (II) y/o (III) está invertida, y en el que dicha secuencia o secuencias de aminoácidos están al menos parcialmente compuestas de isómeros de D-aminoácidos.
- 22.- Un método para producir un péptido de fusión según cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 21, mediante una síntesis peptídica en fase sólida.
- 45 23.- Un ácido nucleico que codifica un péptido de fusión según cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 16 o 20.
- 24.- Un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 23.
- 50 25.- Una célula hospedante que comprende ADN introducido de modo exógeno según la reivindicación 23, en particular un vector según la reivindicación 24, que es capaz de expresar dicho péptido de fusión, en la que dichas células no comprenden células precursoras embrionarias humanas.

- 26.- Un método para producir un péptido de fusión según cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 16 o 20, en el que se fermentan células microbianas o animales transformadas para incluir un ácido nucleico que codifica el péptido de fusión, y se recupera el péptido de fusión.
- 5 27.- El método para producir un péptido de fusión según la reivindicación 26, en el que las células microbianas o animales se cultivan bajo condiciones en las que el péptido de fusión es exportado desde las células.
- 28.- Una formulación que contiene el péptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que el péptido de fusión se formula en forma neutra o salina, en particular como la sal acetato.
- 29.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 21, como un medicamento para su uso en terapia humana o animal.
- 10 30.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 21, un ácido nucleico según la reivindicación 23, un vector según la reivindicación 24, una célula hospedante según la reivindicación 25, o una formulación según la reivindicación 28, para su uso para el tratamiento de la diabetes melitus de tipo I o de tipo II, la resistencia a la insulina, enfermedades y trastornos del peso o afecciones relacionadas con estos.
- 15 31.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 21, un ácido nucleico según la reivindicación 23, un vector según la reivindicación 24, una célula hospedante según la reivindicación 25, o una formulación según la reivindicación 28, para su uso para el tratamiento de enfermedades y trastornos neurodegenerativos o afecciones relacionadas con estos.
- 20 32.- Un péptido de fusión según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 a 21, un ácido nucleico según la reivindicación 23, un vector según la reivindicación 24, una célula hospedante según la reivindicación 25, o una formulación según la reivindicación 28, para su uso para el tratamiento de enfermedades y trastornos o afecciones relacionadas con la apoptosis.

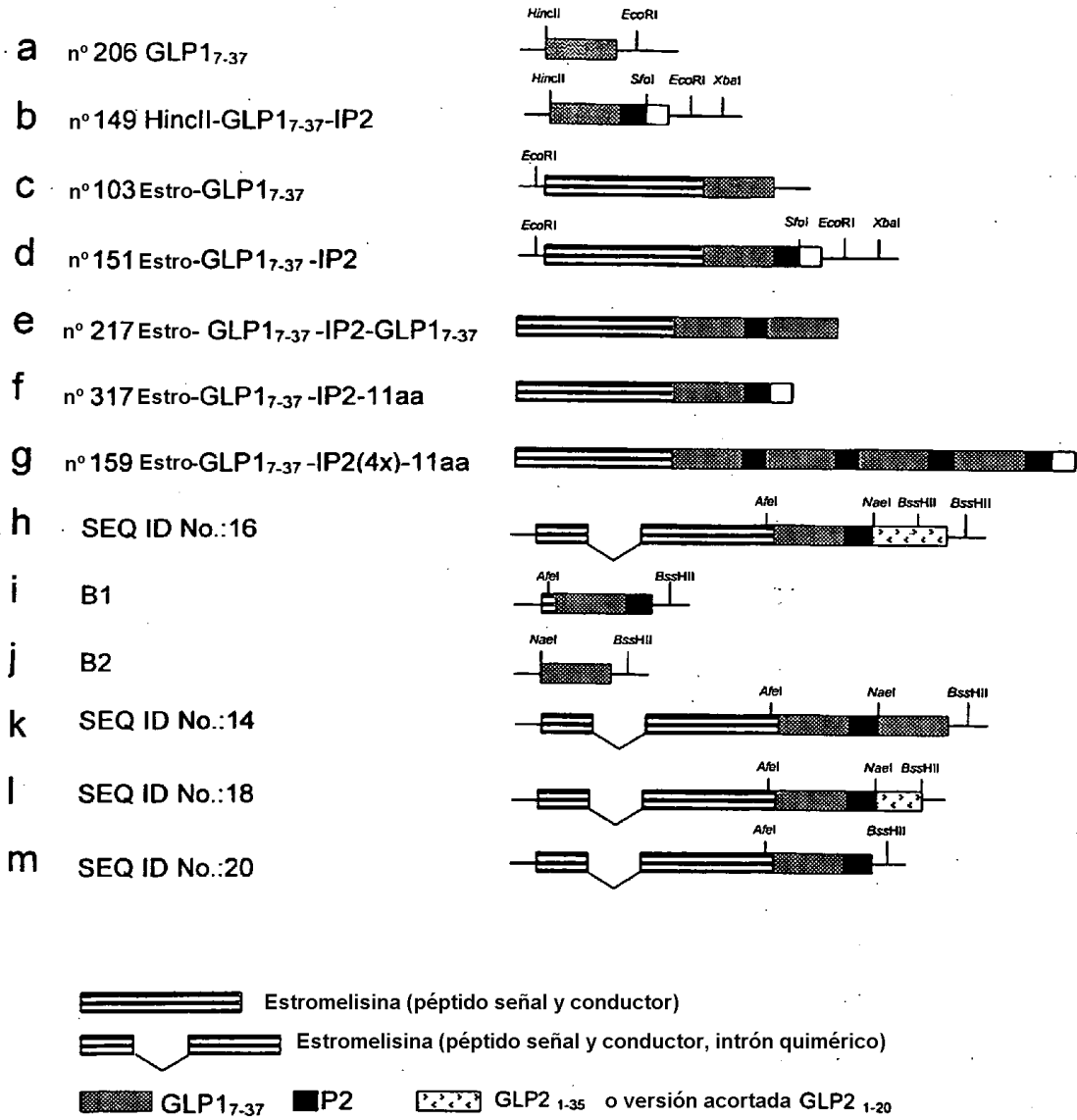


Figura 1



GLP-1 activo después de la transfección transitoria de células hTERT-MSK y HEK293

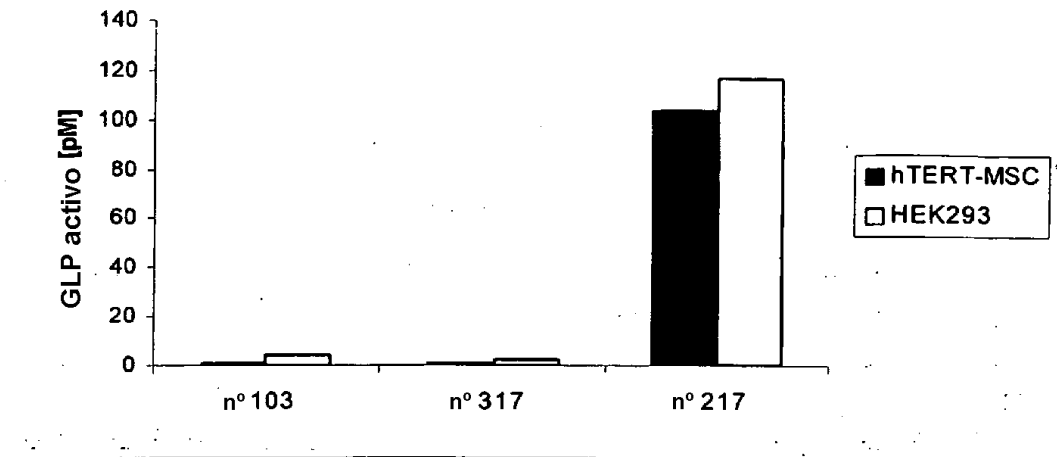


Figura 2



**Figura 3**

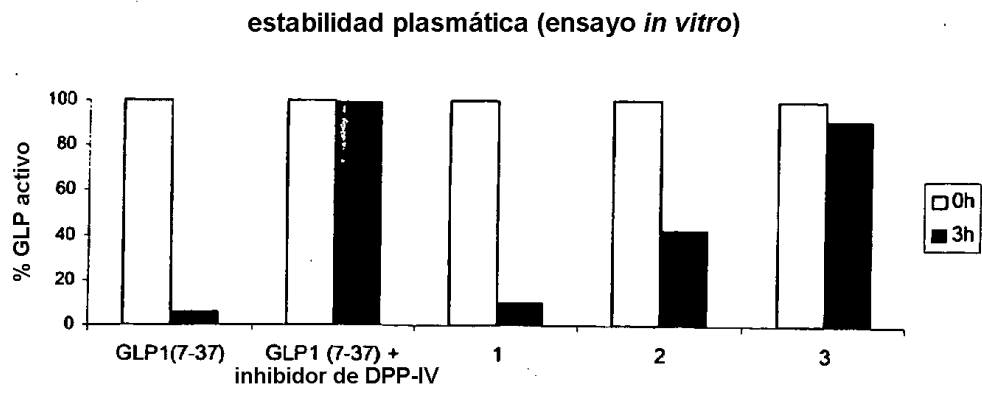
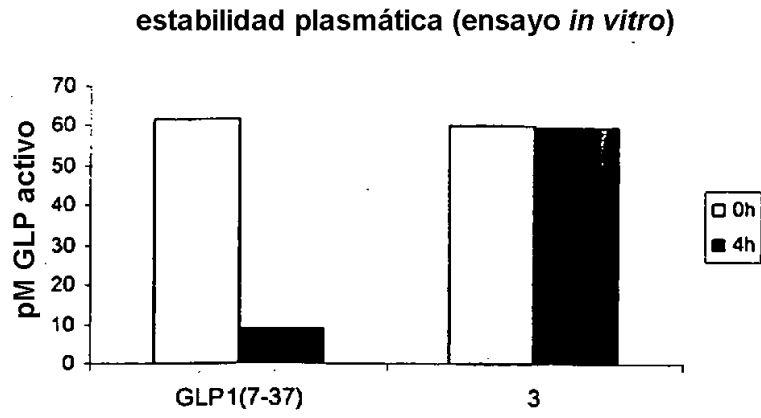
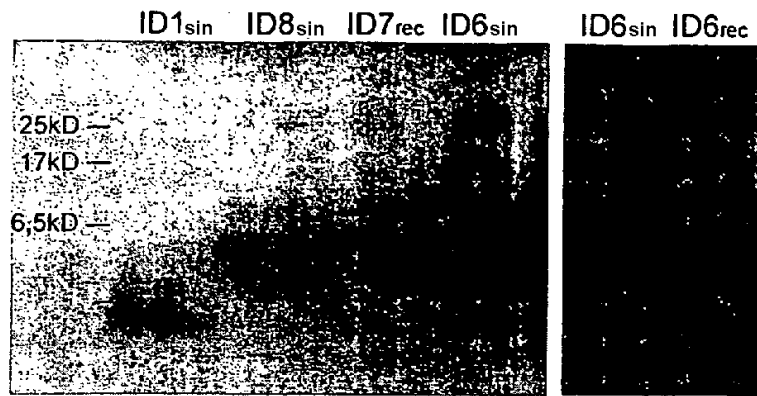


Figura 4



**Figura 5**



**Figura 6**

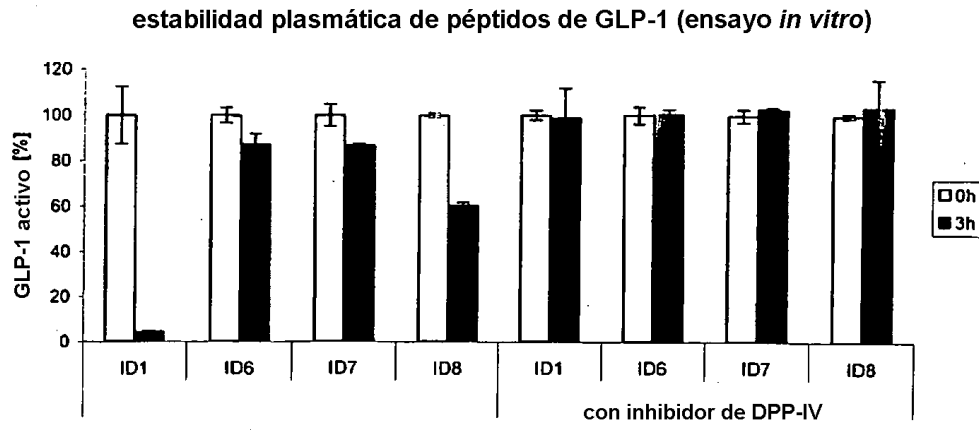


Figura 7

bioensayo *in vitro*: producción de AMPc

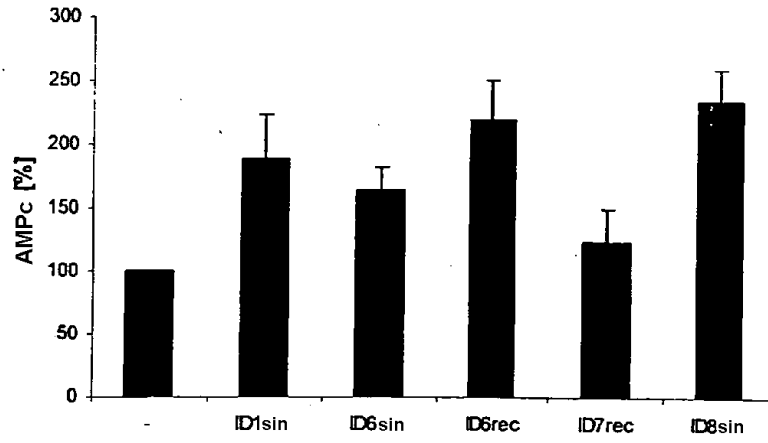


Figura 8

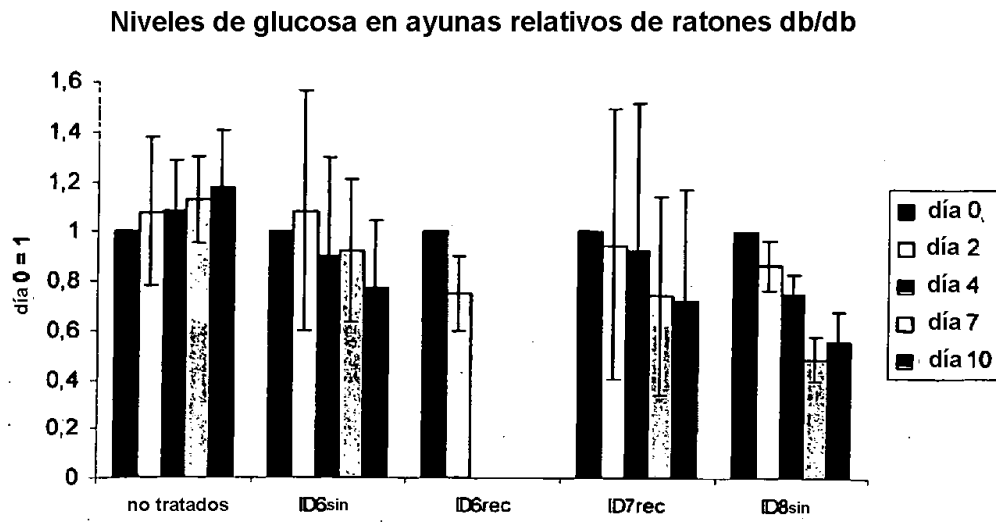
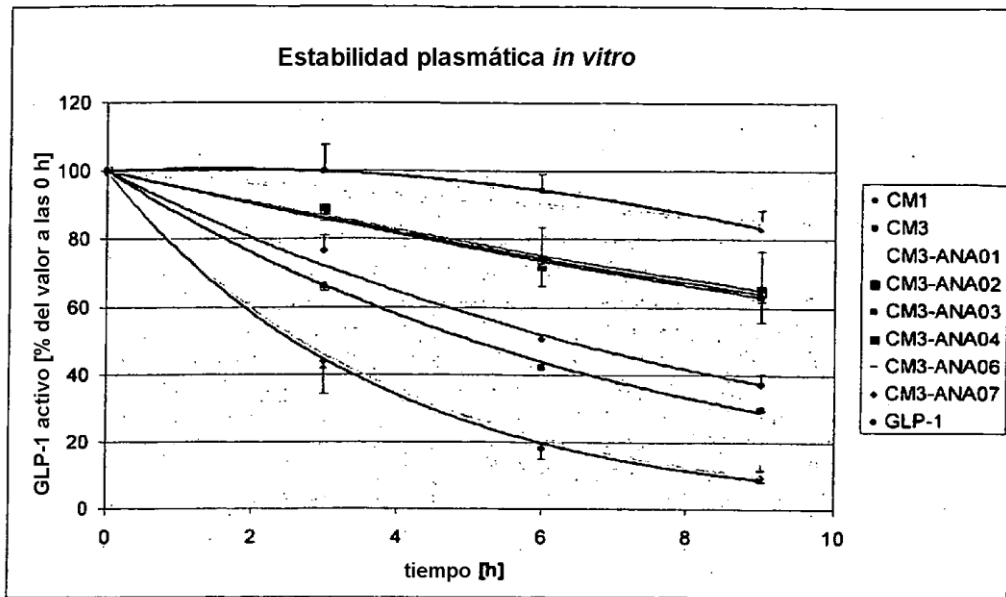


Figura 9





**Figura 10**

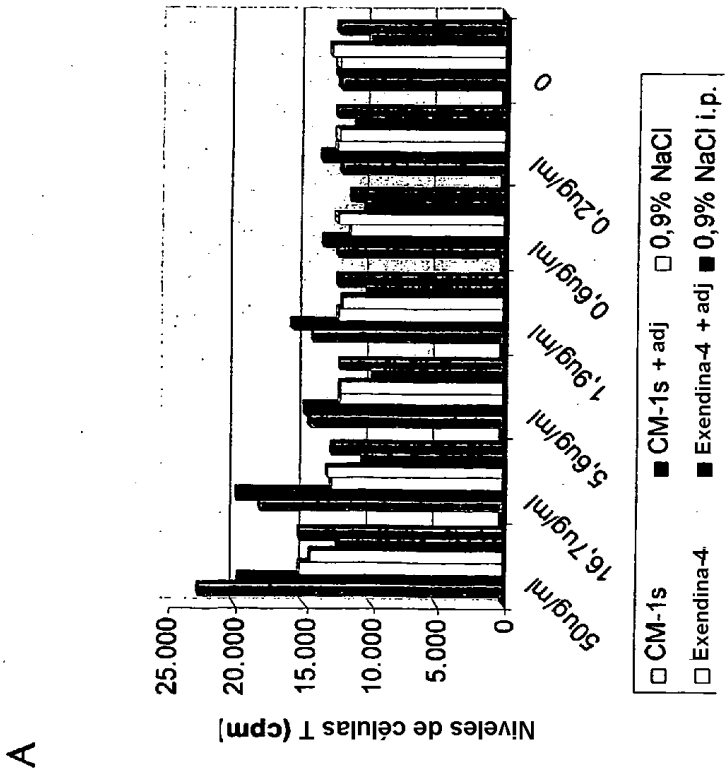
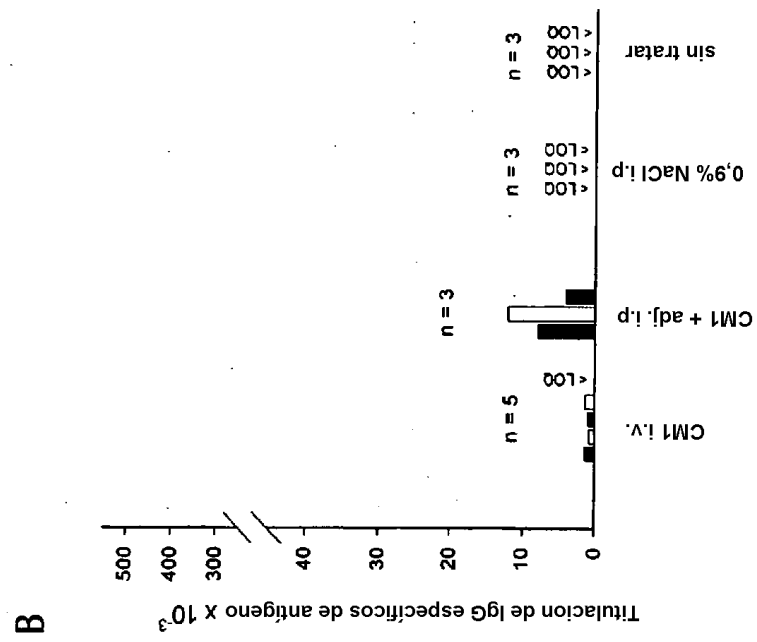


Figura 11

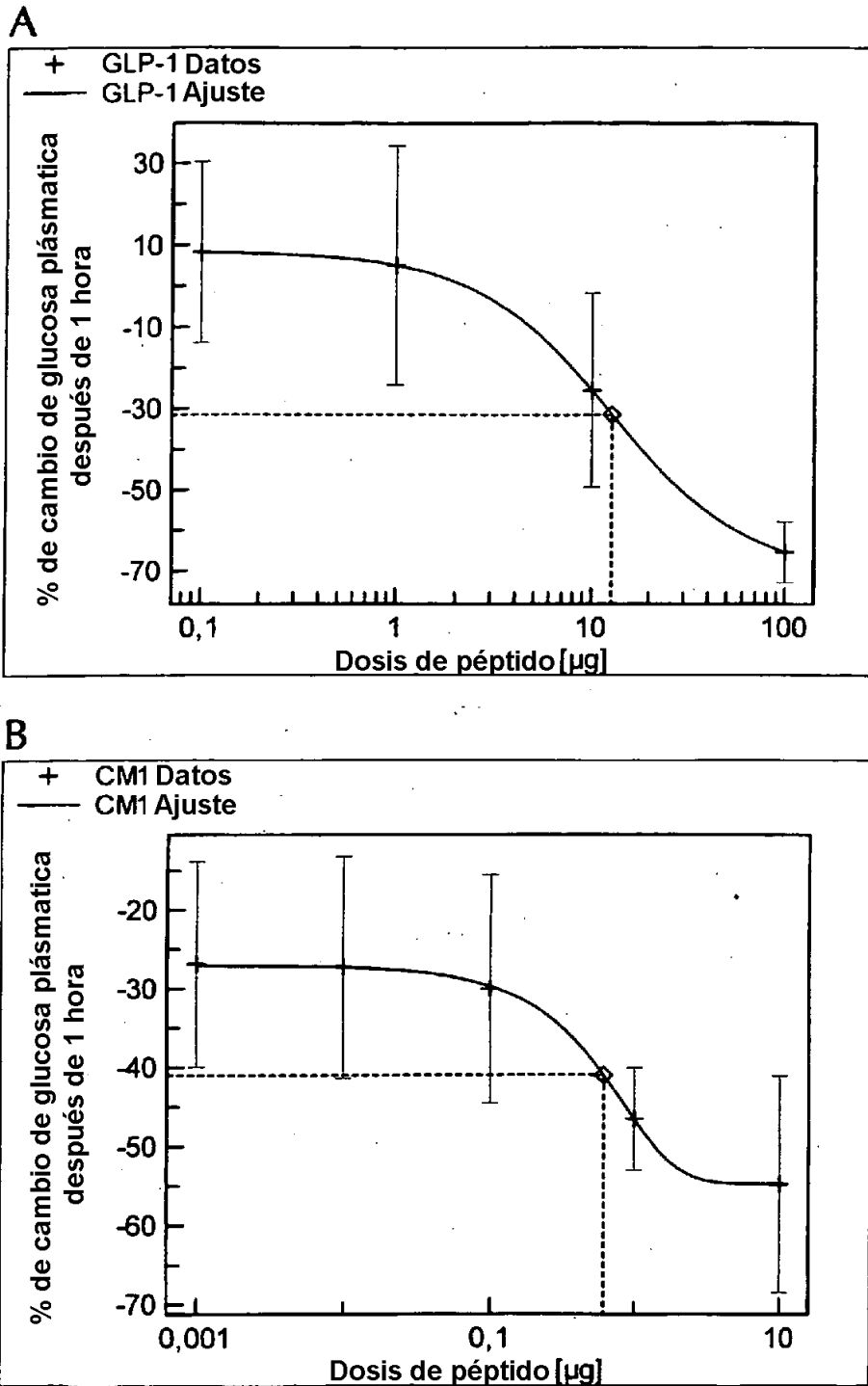
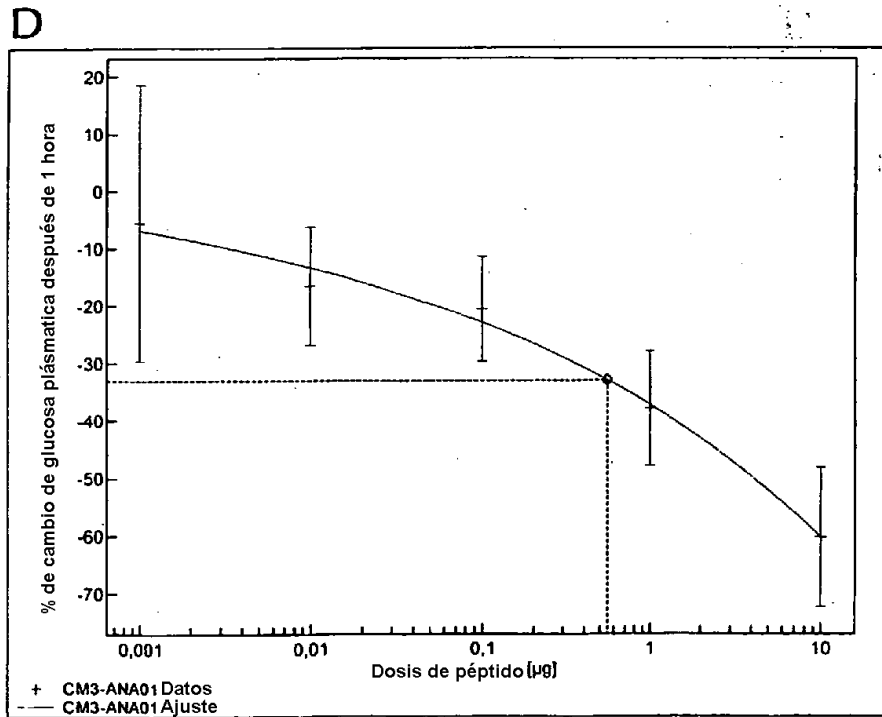
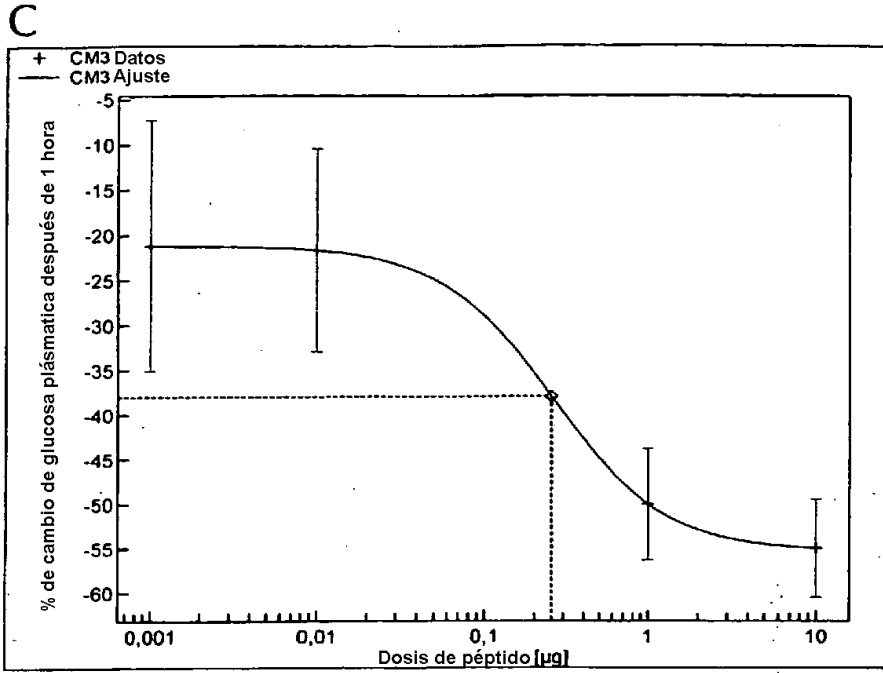
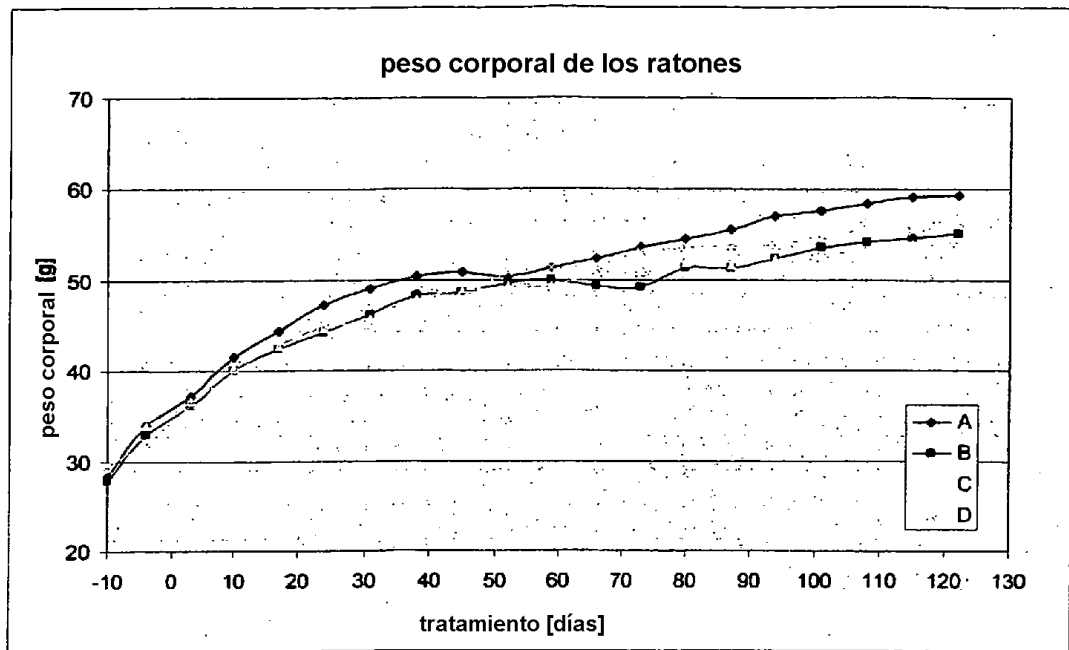


Figura 12



**Figura 12 (continuación)**

A



B

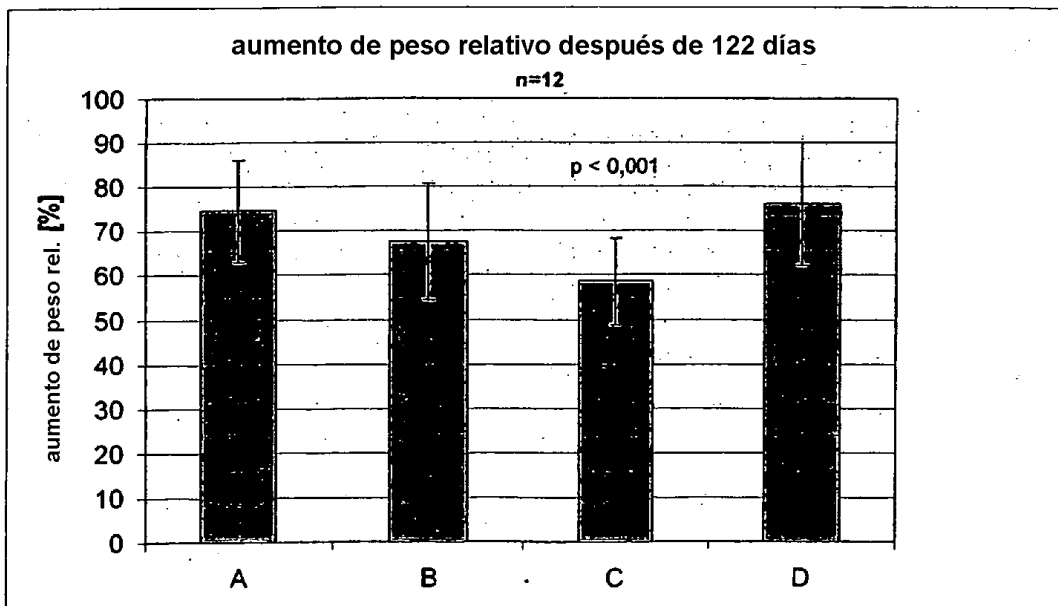
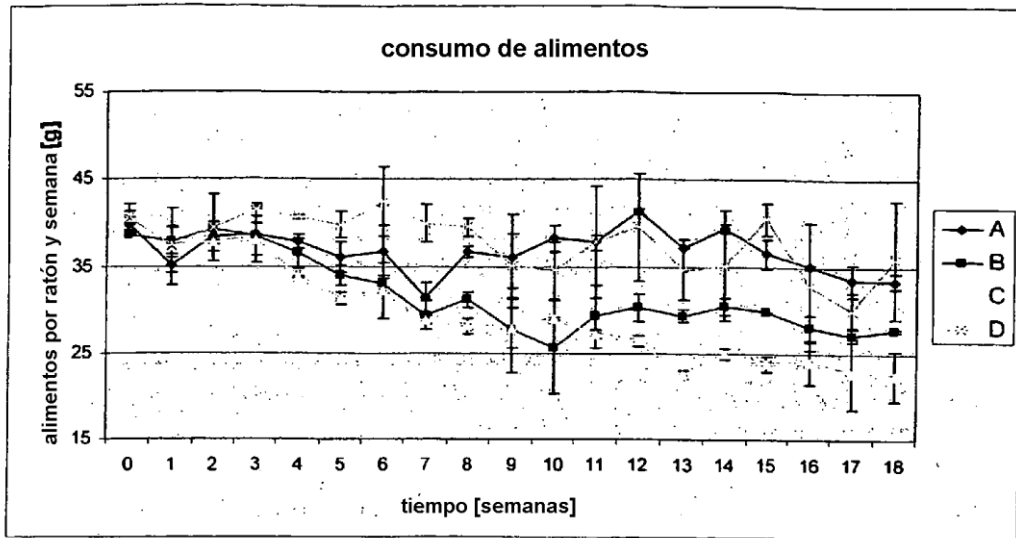
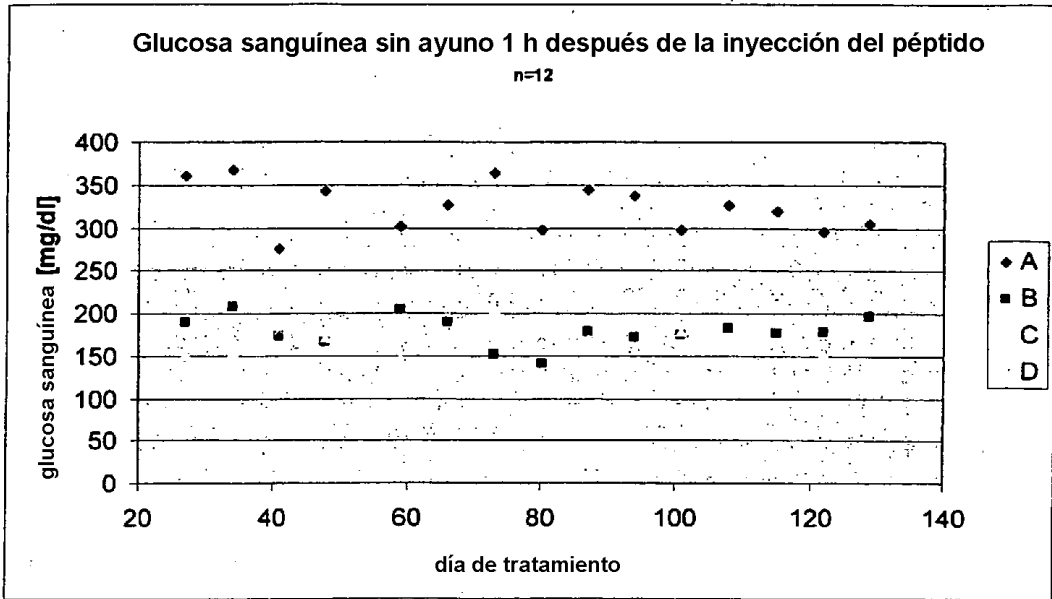


Figura 13



**Figura 14**

A



B

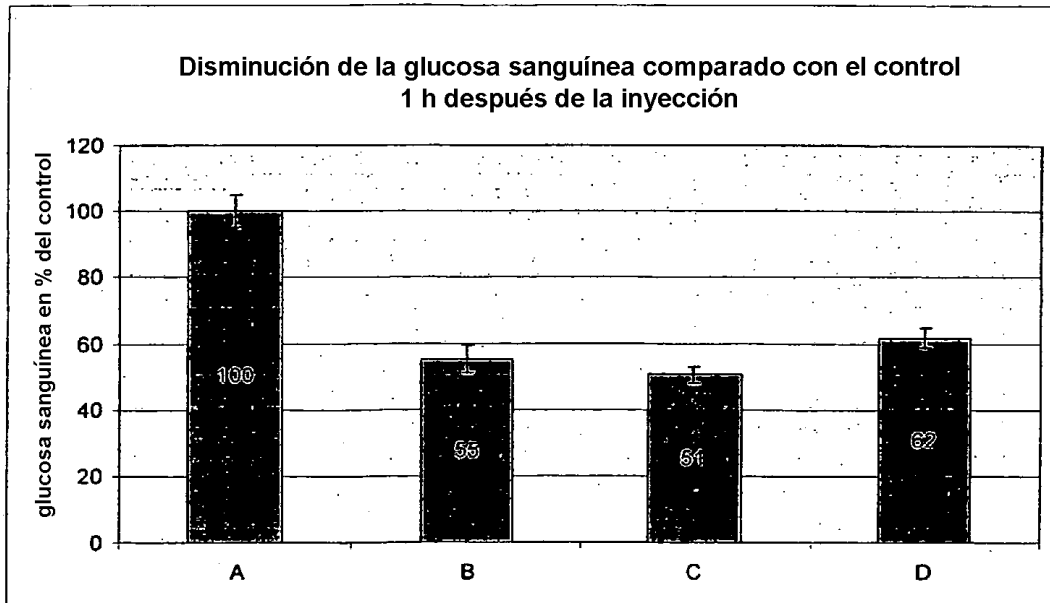


Figura 15

C

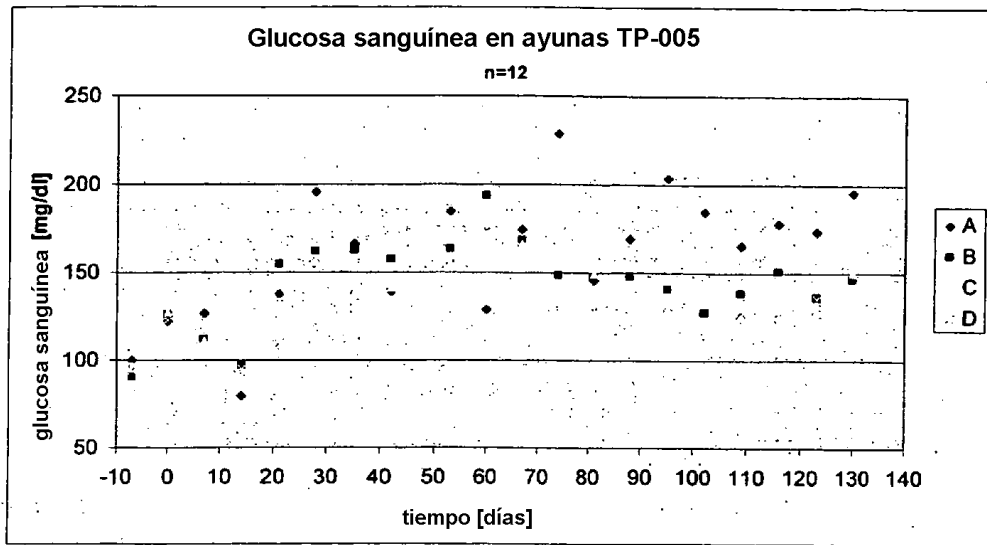
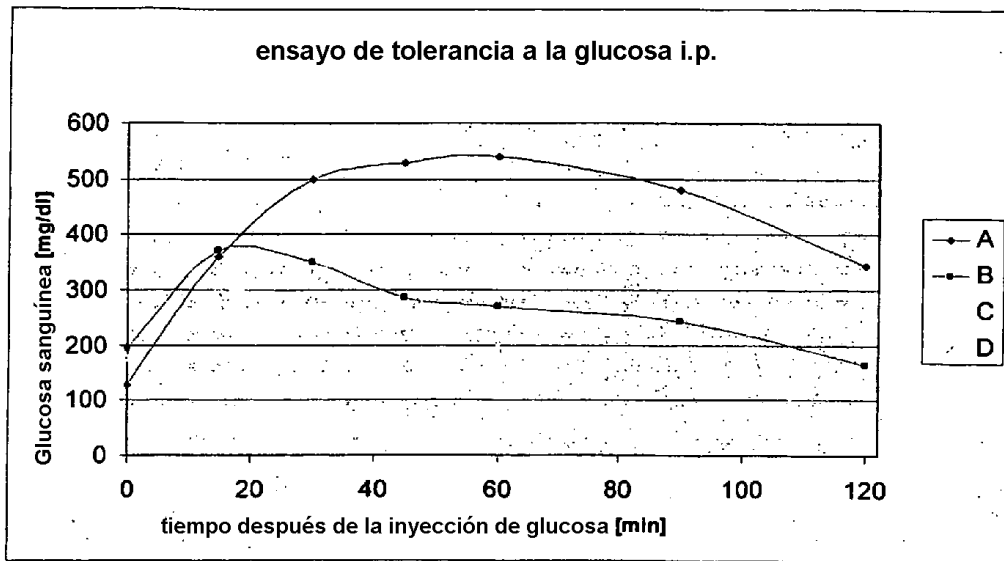


Figura 15 (continuación)



A



B

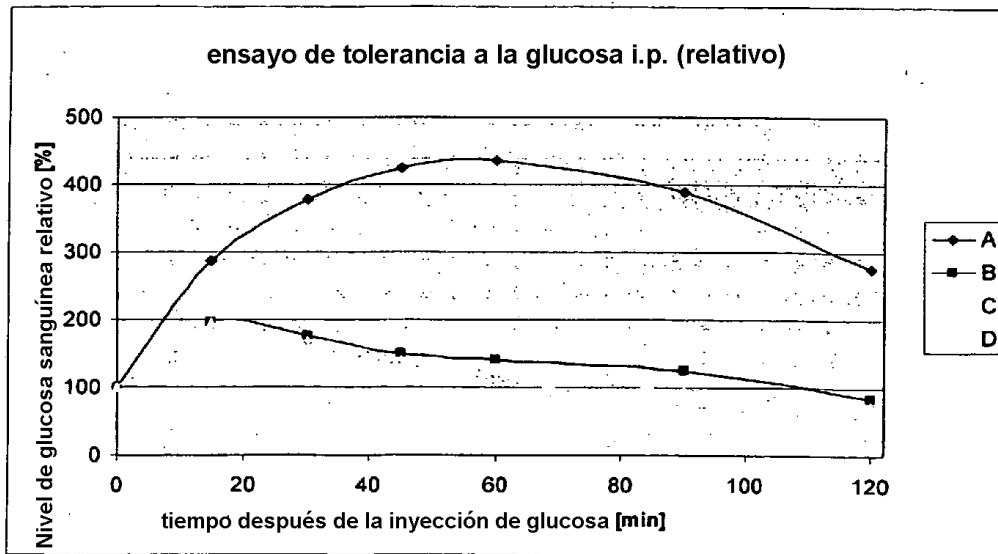


Figura 16

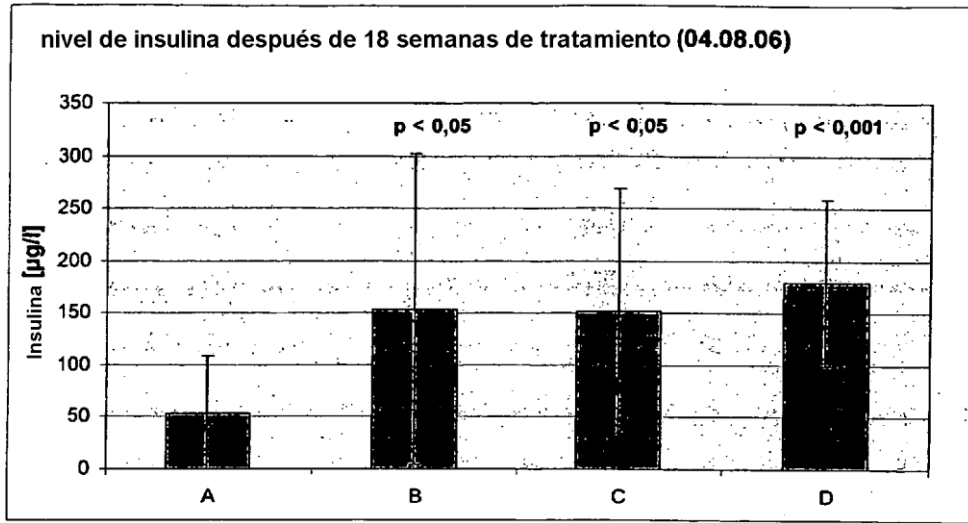
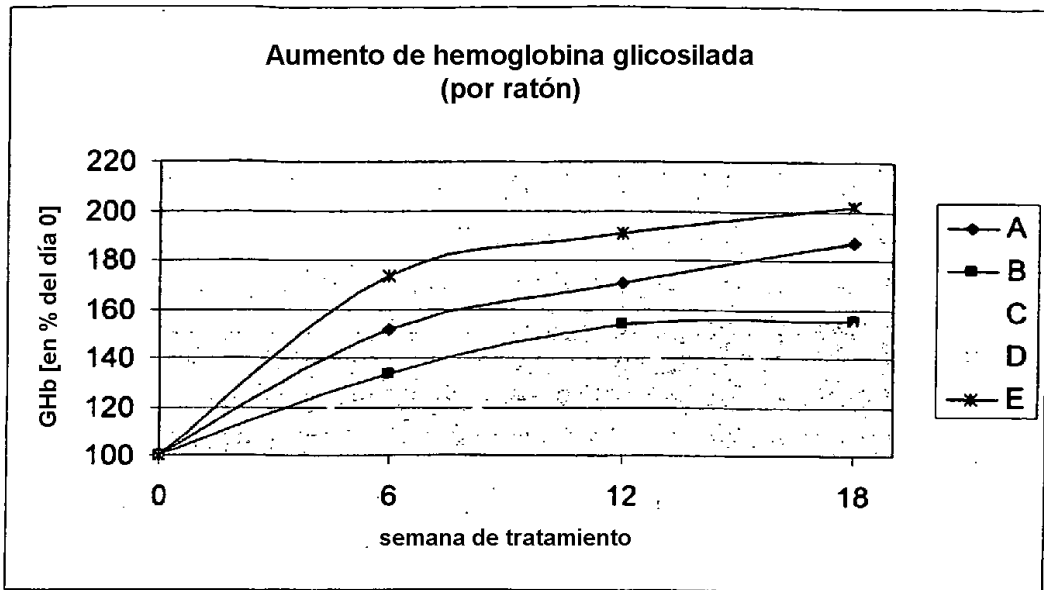


Figura 17

A



B

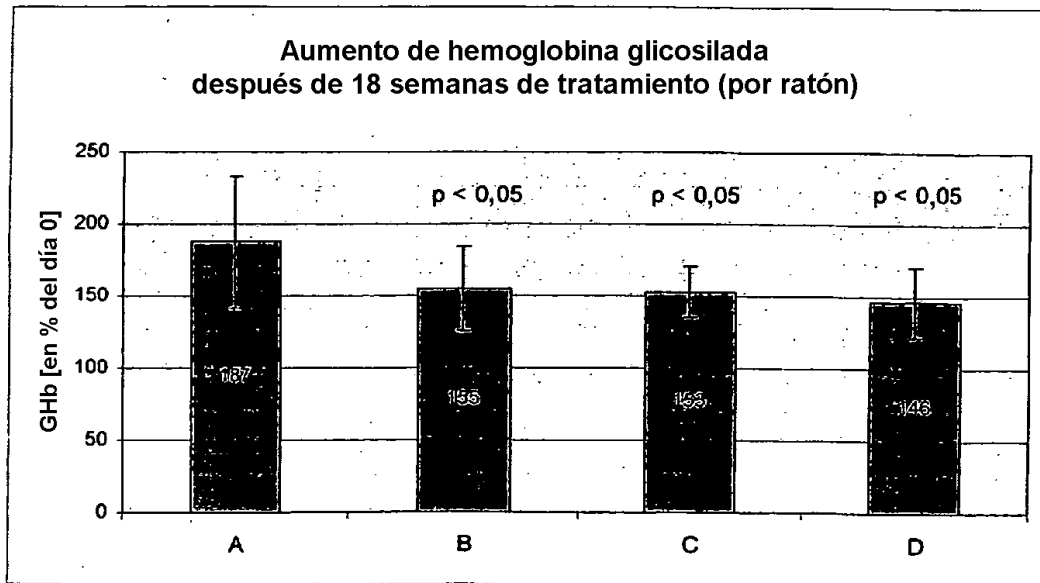
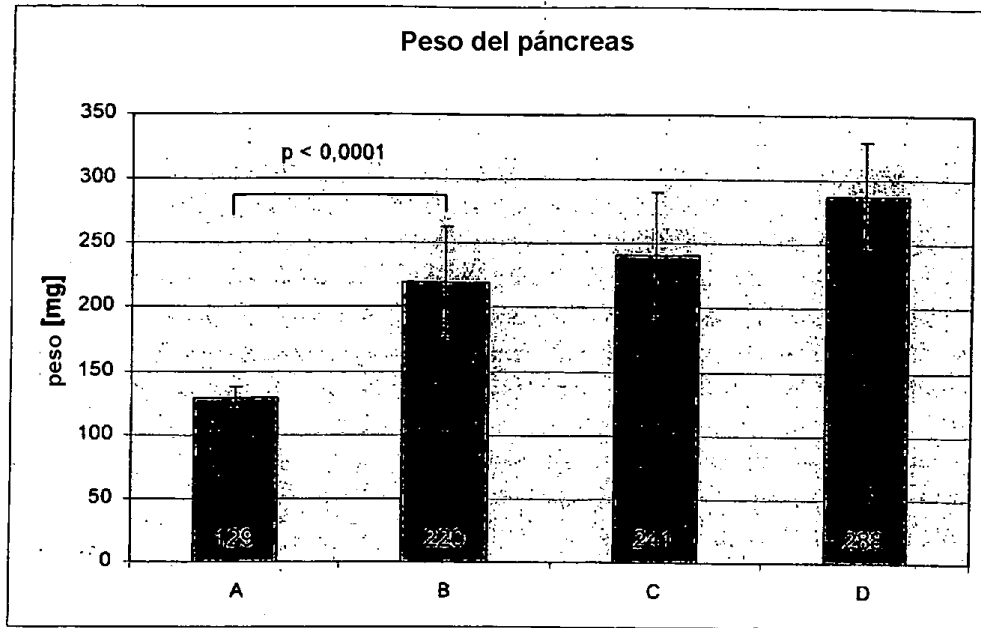
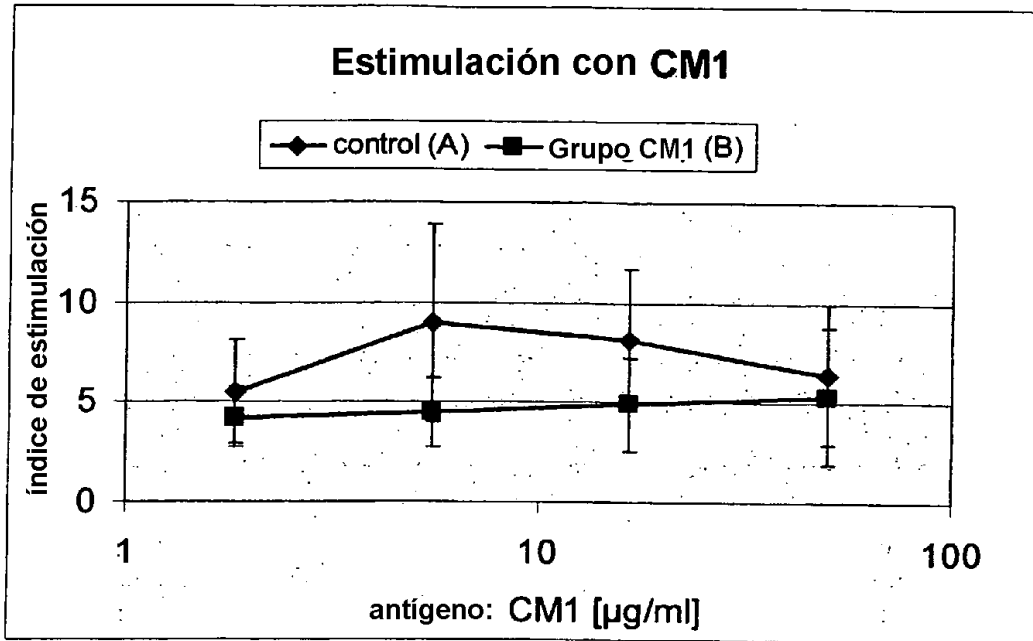


Figura 18



**Figura 19**

A



B

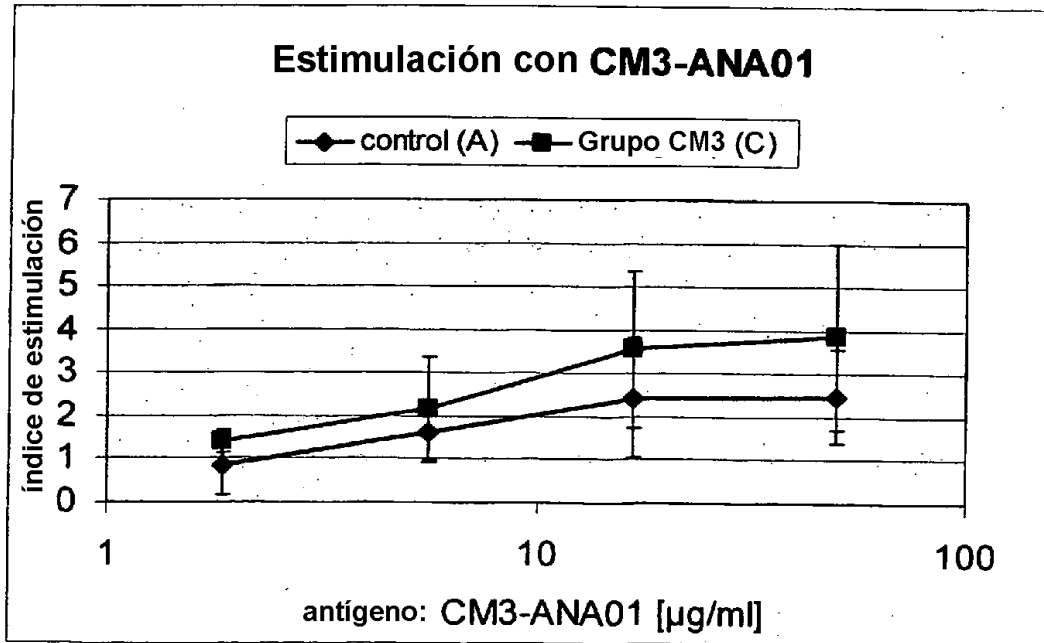


Figura 20

C

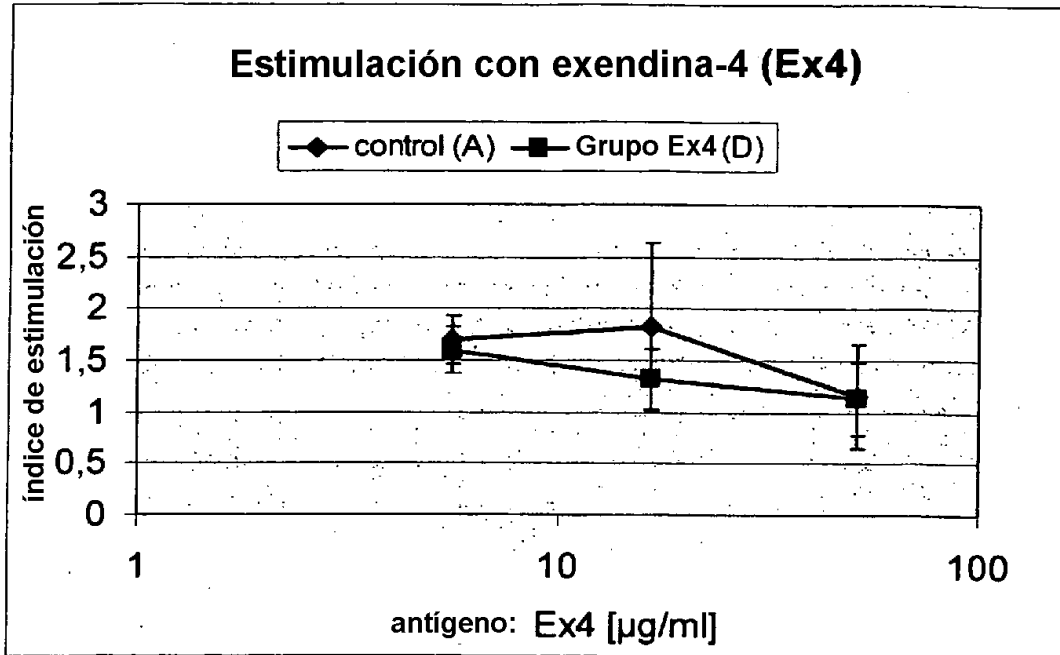


Figura 20 (continuación)