

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 091**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2011 E 11767876 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2621538**

54 Título: **Polipéptidos modificados genéticamente que tienen duración de acción potenciada**

30 Prioridad:

10.12.2010 US 422085 P
28.09.2010 US 387391 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2016

73 Titular/es:

AMYLIN PHARMACEUTICALS, LLC (50.0%)
9360 Towne Centre Drive
San Diego, CA 92121, US y
ASTRAZENECA PHARMACEUTICALS, LP (50.0%)

72 Inventor/es:

ERICKSON, MARY;
LITZINGER, DAVID C.;
GHOSH, SOUMITRA S.;
GUO, ZIJIAN;
SUN, CHENGZAO;
SOARES, CHRISTOPHER J.;
SAMANT, MANOJ P.;
LEVY, ODILE E.;
MAMEDOVA, LALA;
NERAVETLA, SWETHA y
SHARMA, ABHINANDINI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 563 091 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 modificados genéticamente que tienen duración de acción potenciada

5 Antecedentes de la invención

La presente solicitud describe polipéptidos modificados genéticamente. Estos compuestos tienen buena duración de acción, alta potencia y/o regímenes de dosificación convenientes incluyendo administración oral, y método de uso de los mismos. Se proporcionan en el presente documento polipéptidos modificados genéticamente que incorporan un dominio de unión a albúmina en combinación con un péptido biológicamente activo. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que debido a que los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento pueden unirse con albúmina, los compuestos pueden secuestrarse (por ejemplo, unirse a albúmina) mientras que están en circulación lo que conduce a aumento de la duración de acción, debido a, por ejemplo, eliminación renal y/o degradación reducidas. Las enfermedades susceptibles a dicho tratamiento incluyen obesidad y sobrepeso, diabetes, dislipidemia, hiperlipidemia, síndrome del intestino corto, enfermedad de Alzheimer, enfermedad del hígado graso, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardiovascular y otros trastornos del sistema nervioso central o combinaciones de los mismos.

Li *et al.* describen un polipéptido modificado genéticamente que comprende una secuencia de polipéptido de dominio de unión a albúmina (ABD) fusionada con GLP-1 o exendina-4 (A protease-based strategy for the controlled release of therapeutic peptides, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 122(29):5050-5053). Andersen y Sandlie describen una exendina-4 conjugada con maleimida de albúmina (The versatile MHC Class I-related FcRn Protects IgG and Albumin from Degradation: Implications for the Development of New Diagnostics and Therapeutics, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, Japanese Society for the Study of Xenobiotics (JSSX), 24(4):318-332). Se dice que los polipéptidos tienen una semivida aumentada y son útiles en el tratamiento de la diabetes.

Sigue existiendo la necesidad de desarrollar polipéptidos útiles en las enfermedades, afecciones y trastornos metabólicos anteriormente descritos. En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos modificados genéticamente con semividas extendidas útiles para tratar las afecciones anteriores y métodos para producirlos y usarlos.

Breve resumen de la invención

La invención se refiere a un polipéptido modificado genéticamente que comprende una secuencia de polipéptido de dominio de unión a albúmina (ABD) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 35, y una primera secuencia de dominio de hormona peptídica (HD1) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3. El polipéptido modificado genéticamente es preferentemente estable en plasma y frente a proteasas en plasma. El polipéptido modificado genéticamente puede comprender además un primer enlazador (L1) que une covalentemente la secuencia de ABD y dicha secuencia de HD1. El polipéptido modificado genéticamente puede comprender la secuencia de ABD como un resto C terminal y la secuencia de HD1 como un resto N terminal y, opcionalmente, el polipéptido modificado genéticamente puede tener una estructura seleccionada de HD1-ABD y HD1-L1-ABD.

En ciertas realizaciones, el enlazador L1 es un enlazador peptídico de 1 a 30 aminoácidos. El enlazador L1 puede seleccionarse de los 20 aminoácidos de origen natural. El enlazador L1 puede comprender un aminoácido no natural incorporado por síntesis química, modificación química post-traduccional o mediante incorporación *in vivo* por expresión recombinante en una célula hospedadora. Los aminoácidos del enlazador L1 pueden seleccionarse de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. El enlazador L1 puede comprender poliglicina, polialanina, poli(Gly-Ala) o poli(Gly-Ser), y, opcionalmente, el enlazador L1 puede comprender la secuencia de aminoácidos (Gly)₃, (Gly)₄ (SEC ID N°: 196), o (Gly)₅ (SEC ID N°: 197). El enlazador L1 puede comprender la secuencia de aminoácidos (Gly)₃Lys(Gly)₄ (SEC ID N°: 131); (Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (SEC ID N°: 132); (Gly)₃Cys(Gly)₄ (SEC ID N°: 133); o GlyProAsnGlyGly (SEC ID N°: 134). El enlazador L1 puede comprender uno de los siguientes: combinaciones de Gly y Ala; combinaciones de Gly y Ser; un dipéptido TG N terminal; un dipéptido AS C terminal; o un dipéptido TG N terminal y un dipéptido AS C terminal. El enlazador L1 puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de TG-(GGGS)₁ (SEC ID N°: 198), TG-(GGGS)₂ (SEC ID N°: 199), TG (GGGS)₃ (SEC ID N°: 200), TG-(GGGS)₄ (SEC ID N°: 201), TG-(GGGS)₅ (SEC ID N°: 202), (GGGS)₁-AS (SEC ID N°: 203), (GGGS)₂-AS (SEC ID N°: 204), (GGGS)₃-AS (SEC ID N°: 205), (GGGS)₄-AS (SEC ID N°: 206), (GGGS)₅-AS (SEC ID N°: 207), TG-(GGGS)₁-AS (SEC ID N°: 208), TG-(GGGS)₂-AS (SEC ID N°: 209), TG-(GGGS)₃-AS (SEC ID N°: 210), TG (GGGS)₄-AS (SEC ID N°: 211) y TG-(GGGS)₅-AS (SEC ID N°: 212), y, opcionalmente, el dipéptido TG o dipéptido AS del enlazador L1 está ausente o se reemplaza por un par de aminoácidos seleccionado de T, A, S y G.

En ciertas realizaciones, el polipéptido modificado genéticamente comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 95.

La invención se refiere además al polipéptido modificado genéticamente para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno. Opcionalmente, la enfermedad o el trastorno se seleccionan de diabetes, prediabetes,

sobrepeso, obesidad, enfermedad de Alzheimer, síndrome del intestino corto, enfermedad del hígado graso, dislipidemia, enfermedad de las arterias coronarias, ictus, hiperlipidemia y enfermedad de Parkinson. Preferentemente, la enfermedad o el trastorno es diabetes de tipo I, diabetes de tipo II o prediabetes. El método incluye administrar un polipéptido modificado genéticamente como se describe en el presente documento a un sujeto.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el polipéptido modificado genéticamente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición farmacéutica se selecciona de una composición farmacéutica oral y una composición farmacéutica de liberación sostenida o de larga duración.

Los compuestos polipeptídicos modificados genéticamente tienen afinidad de unión por albúmina y una utilidad terapéutica adicional. El polipéptido de dominio de unión a albúmina (ABD) es capaz de unirse con albúmina. El polipéptido de dominio hormonal (HD1) puede estar biológicamente activo y puede inducir una respuesta biológica beneficiosa, en enlace covalente con el ABD. El polipéptido de ABD o HD1 puede opcionalmente unirse covalentemente en el polipéptido modificado genéticamente mediante un enlazador L, por ejemplo L1 como se describe en el presente documento. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que debido a que los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento pueden unirse con albúmina, los compuestos pueden secuestrarse en un sujeto lo que conduce a duración aumentada de la acción en el sujeto.

Además, se describen polinucleótidos que codifican el polipéptido modificado genéticamente y sus intermedios, vectores de expresión que portan dichos polinucleótidos, células hospedadoras que expresan dichos polinucleótidos y medios para su expresión, síntesis, modificación pos-traduccional y aislamiento.

Una ventaja de la presente invención es que los polipéptidos modificados genéticamente pueden sintetizarse completamente por métodos recombinantes, evitando etapas sintéticas o químicas complejas o adicionales y reactivos y catalizadores sensibles asociados. En consecuencia, los polipéptidos de la presente invención pueden ser mucho menos caros de sintetizar que compuestos derivatizados químicamente de duración de acción prolongada. Además de una larga duración de acción (por ejemplo, al menos una semana en un sujeto humano, aunque también puede conseguirse una vez al día si se desea), una ventaja adicional es un tamaño relativamente pequeño, que puede permitir que el suministro oral mejore la observancia por parte del paciente.

Los compuestos desvelados en el presente documento demuestran eficacia sorprendente en un ensayo de OGTT DOA (ensayo de tolerancia a la glucosa oral para duración de acción) de al menos 24 horas e incluso más hasta 2 días en ratones, lo que se traduce en 7 días o más en seres humanos, un control glucémico robusto y pérdida de peso corporal en ratones obesos diabéticos (ob/ob), y proporcionan una reducción dependiente de la dosis del consumo de alimentos durante al menos dos días en ratones. En ratas normales, la exposición al compuesto dura varios días (incluso hasta 4 días, lo que se traduce en al menos una vez a la semana en seres humanos) después de dosificación subcutánea e intravenosa. Los compuestos son estables en plasma y frente a proteasas en plasma, están activos mientras están unidos a albúmina de suero y proporcionan sorprendentemente mayor eficacia *in vivo* máxima que la exendina-4 como se muestra en el presente documento. Aún más sorprendentemente, los compuestos son adecuados para suministro oral.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1A: Histograma de los datos del nivel de glucosa en sangre (BGL) antes de la sonda 1 día después de la dosificación de Compuesto 15 en el ensayo de OGTT DOA. Glucosa pre-sonda media de vehículo: 117 mg/dl. Leyenda (izquierda a derecha): vehículo (abierto), 2 nmol/kg (diagonal arriba izquierda a abajo derecha); 25 nmol/kg (diagonal de abajo izquierda a arriba derecha); 250 nmol/kg (diagonal fina). Fig. 1B: Cambio en la glucosa en sangre a 30 min. Glucosa pre-sonda media de vehículo: 117 mg/dl. Leyenda: igual que en la Fig. 1A. * $p < 0,5$ frente a control de vehículo; ANOVA, ensayo de Dunnett.

Fig. 2A: Histograma de datos de nivel de glucosa en sangre (BGL) antes de sonda a los 2 días después de la dosificación de Compuesto 15 en el ensayo de OGTT DOA. Glucosa pre-sonda media de vehículo: 135 mg/dl. Leyenda (izquierda a derecha): vehículo (abierto), 25 nmol/kg (líneas verticales); 250 nmol/kg (líneas diagonales). Fig. 2B: Cambio en la glucosa en sangre a los 30 min. Glucosa pre-sonda media de vehículo: 135 mg/dl. Leyenda: igual que en la Fig. 2A. * $p < 0,5$ frente a control de vehículo; ANOVA, ensayo de Dunnett.

Fig. 3A: Histograma de los datos del nivel de glucosa en sangre (BGL) antes de la sonda 1 día después de la dosificación de Compuesto 15 y Compuesto 8 en el ensayo de OGTT DOA. Glucosa pre-sonda media de vehículo: 117 mg/dl. Leyenda (izquierda a derecha): vehículo (abierto), Compuesto 15 2 nmol/kg (diagonal de arriba izquierda a abajo derecha); Compuesto 15 25 nmol/kg (diagonal de abajo izquierda a arriba derecha); Compuesto 15 250 nmol/kg (diagonal fina); Compuesto 8 2 nmol/kg (en mosaico); Compuesto 8 25 nmol/kg (líneas horizontales); Compuesto 8 250 nmol/kg (punteado). Fig. 3B: Cambio en la glucosa en sangre a los 30 min. Glucosa pre-sonda media de vehículo: 117 mg/dl. Leyenda: igual que en la Fig. 1A. * $p < 0,5$ frente a control de vehículo; ANOVA, ensayo de Dunnett.

Fig. 4: Efecto del Compuesto 15 en ratas anestesiadas a las que se alimentó con HSD. Fig. 4A: Ciclo temporal de glucosa después del ensayo de tolerancia a la glucosa intravenosa (IVGTT). Leyenda: vehículo (triángulo con la punta hacia arriba); Compuesto 15 a 240 nmol/kg (caja). Fig. 4B: Histograma que representa glucosa (ABC, 0-60 min) después de IVGTT. Leyenda: vehículo (izquierda); Compuesto 15 (derecha). Fig. 4C: Ciclo temporal de insulina después de IVGTT. Leyenda: Como en la Fig. 4A. Fig. 4D: Histograma que representa el cambio en insulina (ABC, 0-30 min). Leyenda: Como en la Fig. 4B. Fig. 4E: Ciclo temporal de cambio en el peso corporal después de inyección sc del Compuesto 15. Leyenda: Como en la Fig. 4A. Fig. 4F: Histograma del consumo de alimentos diario después de inyección sc del Compuesto 15. Leyenda: para cada día, el histograma representa el vehículo y el Compuesto 15 (24 nmol/kg) en orden de izquierda a derecha. * $p < 0,05$ frente a control de vehículo; ensayo de Dunnett.

Fig. 5: Efecto del Compuesto 15 en ratones ob/ob. Fig. 5A: Ciclo temporal de cambio del peso corporal (0-10 días) después de inyección del Compuesto 15 a 250 nmol/kg. Leyenda: Vehículo (cuadrado); Compuesto 15 (triángulo). Fig. 5B: Ciclo temporal de cambio en la glucosa en sangre después de dosificación como se ha descrito para la Fig. 5A. Leyenda: Como en la Fig. 5A. Fig. 5C: Ciclo temporal de cambio en HbA_{1c} después de dosificación como se ha descrito para la Fig. 5A. Leyenda: Como en la Fig. 5A. * $p < 0,5$ frente a control de vehículo; ANOVA, ensayo de Dunnett.

Fig. 6: Efectos del Compuesto 15 en ratas Grasas Diabéticas de Zucker. Fig. 6A: Ciclo temporal de cambio del peso corporal después del tratamiento de ratas Grasas Diabéticas de Zucker con el Compuesto 15. Fig. 6B: Ciclo temporal de glucosa en plasma (mg/dl) después del tratamiento con el Compuesto 15. Leyenda: Vehículo (caja sólida); Compuesto 15 (0,17 mg/kg) (triángulo con la punta hacia arriba); Compuesto 15 (0,5 mg/kg) (triángulo con la punta hacia abajo).

Fig. 7: Comparación en OGTT DOA. Se evaluaron los efectos de los Compuestos 15, 8 y 10, en comparación con exendina-4, como el cambio de glucosa en sangre a los 30 min (% pre-sonda). Leyenda: compuestos en orden de izquierda a derecha del histograma: vehículo; Compuesto 15 a 2 nmol/kg; Compuesto 15 a 25 nmol/kg; Compuesto 15 a 250 nmol/kg; Compuesto 8 a 2 nmol/kg; Compuesto 8 a 25 nmol/kg; Compuesto 8 a 250 nmol/kg. * $p < 0,5$ frente a control de vehículo; ANOVA, ensayo de Dunnett.

Fig. 8: Presenta un perfil temporal de porcentaje de compuesto restante en plasma humano durante un ciclo temporal de 5 horas. Leyenda: Péptido (SEC ID N°: 4) (caja cerrada); Compuesto 7 (caja abierta); Compuesto 31 (cruz); Compuesto 15 (rombo abierto); GLP-1(7-36)amida (rombo cerrado).

Fig. 9: Histograma de datos de niveles de glucosa en sangre (BGL) antes de la sonda el día 1 después de la dosificación del Compuesto 31. Glucosa pre-sonda media de vehículo: 126 mg/dl. Leyenda: vehículo (abierto), Compuesto 31 (25 nmol/kg; cerrado). Leyenda: igual que la Fig. 1A. * $p < 0,5$ frente a control de vehículo; ANOVA, ensayo de Dunnett.

Fig. 10: La Fig. 10A demuestra el ciclo temporal del efecto del Compuesto 31 en la inhibición del consumo de alimentos en ratones normales durante 6 horas. Leyenda: vehículo (caja); Compuesto 31 a 1 nmol/kg (rombo); Compuesto 31 a 10 nmol/kg (cruz); Compuesto 31 a 30 nmol/kg (círculo); Compuesto 31 a 100 nmol/kg (estrella). La Fig. 10B representa un histograma de resultados del efecto del Compuesto 31 en la inhibición del consumo de alimentos en ratones normales durante 54 horas. Leyenda (de izquierda a derecha para cada periodo temporal): vehículo (abierto); [¹⁴Leu]exendina-4 a 1 nmol/kg (líneas verticales); [¹⁴Leu]exendina-4 a 10 nmol/kg (líneas diagonales, de arriba izquierda a abajo derecha); [¹⁴Leu]exendina-4 a 30 nmol/kg (líneas diagonales, de abajo izquierda a arriba derecha); [¹⁴Leu]exendina-4 a 100 nmol/kg (líneas diagonales finas); Compuesto 31 a 1 nmol/kg (líneas verticales); Compuesto 31 a 10 nmol/kg (puntos ligeros); Compuesto 31 a 30 nmol/kg (puntos pesados); Compuesto 31 a 100 nmol/kg (a cuadros).

Fig. 11: Fig. 11A (Compuesto 15) y Fig. 11B (Compuesto 21) representan el ciclo temporal de cambios en la glucosa en sangre en comparación con liraglutida, todos proporcionados dos veces a la semana (BIW). Leyenda (Figs. 11A-11B): vehículo (caja); liraglutida a 250 nmol/kg BIW (triángulo cerrado); compuesto de ensayo a 25 nmol/kg BIW (triángulo abierto); compuesto de ensayo a 250 nmol/kg BIW (rombo). La Fig. 11C representa un histograma que muestra la reducción de HbA_{1c} (% de cambio desde la línea basal) para el Compuesto 15 y el Compuesto 21 proporcionado dos veces a la semana (BIW), en comparación con exendina-4 proporcionada por infusión subcutánea continua (CSI). Leyenda (de izquierda a derecha): vehículo (abierto); Compuesto 15 a 25 nmol/kg BIW (a cuadros finos); Compuesto 15 a 250 nmol/kg BIW (punteado); Compuesto 21 a 25 nmol/kg BIW (cuadrícula diagonal); Compuesto 21 a 250 nmol/kg BIW (cuadrícula vertical-horizontal); exendina-4 a 7,2 nmol/kg/día CSI (mosaico oscuro); exendina-4 a 100 nmol/kg/día CSI (mosaico claro). La Fig. 11D representa la reducción del peso corporal (% de cambio desde la línea basal) para el Compuesto 15 y Compuesto 21 proporcionados dos veces a la semana (BIW), en comparación con exendina-4 proporcionada por infusión subcutánea continua (CSI). Leyenda (de izquierda a derecha): como en la Fig. 11C.

Fig. 12: Las Figs. 12A-12C representan el perfil farmacocinético (PK) y la actividad biológica de los polipéptidos modificados genéticamente ejemplares Compuesto 15 y Compuesto 21 dosificados por vía subcutánea en ratas

Harlan Sprague-Dawley (HSD) normales. La Fig. 12A representa el efecto de los compuestos para reducir el consumo de alimentos. La Fig. 12B representa el efecto de los compuestos para reducir el peso corporal. La Fig. 12C representa un perfil PK de los compuestos después de una única dosis. Leyenda: vehículo (caja); Compuesto 21 (triángulo); Compuesto 15 (rombo).

Fig. 13: Las Figs. 13A-13C representan el perfil farmacocinético (PK) y la actividad biológica de un polipéptido modificado genéticamente ejemplar Compuesto 31 en comparación con análogo de exendina no conjugado dosificado por vía intravenosa en ratas Harlan Sprague-Dawley (HSD) normales. La Fig. 13A representa el efecto de los compuestos para reducir el consumo de alimentos. La Fig. 13B representa el efecto de los compuestos para reducir el peso corporal. La Fig. 13C representa un perfil PK de los compuestos después de una única dosis. Inserto: tabulación de los resultados de tiempo frente a PK (pg/ml) para [¹⁴Leu]exendina-4 a 2 nmol/kg IV y Compuesto 31 a 2 nmol/kg IV. Leyenda: vehículo (rombo); [¹⁴Leu]exendina-4 a 2 nmol/kg IV (caja) Compuesto 31 a 2 nmol/kg IV (círculo).

Fig. 14: Esta figura representa un ciclo temporal de actividad biológica de un polipéptido modificado genéticamente ejemplar (Compuesto 15) en comparación con análogo de exendina no conjugado para reducir la glucosa en sangre después del suministro oral. Véase Ejemplo 18. Glucosa pre-tratamiento media: ~623 mg/dl. Leyenda: vehículo (caja cerrada); análogo de exendina-4 (caja abierta); Compuesto 15 (rombo).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

“Obesidad” y “sobrepeso” se refieren a mamíferos que tienen un peso mayor de lo esperado normalmente, y pueden determinarse mediante, por ejemplo, la aparición física, el índice de masa corporal (IMC) como se conoce en la técnica, las relaciones de circunferencia de cintura frente a cadera, el grosor del pliegue cutáneo, la circunferencia de la cintura y similares. El Centro para Control y Prevención de Enfermedades (CDC) define el sobrepeso como un adulto humano que tiene un IMC de 25 a 29,9; y define obeso como un adulto humano que tiene un IMC de 30 o más. Existen medidas adicionales para la determinación de la obesidad. Por ejemplo, el CDC indica que una persona con una relación de cintura frente a cadera mayor de 1,0 tiene sobrepeso.

La “masa corporal magra” se refiere a la masa sin grasas del cuerpo, es decir, el peso corporal total menos el peso de grasa corporal es masa corporal magra. La masa corporal magra puede medirse por métodos tales como peso hidrostático, cámaras computarizadas, absorciometría de rayos X de energía doble, calibradores cutáneos, captura de imágenes por resonancia magnética (IRM) y análisis de impedancia bioeléctrica (BIA) como se conoce en la técnica.

“Mamífero” se refiere a animales de sangre caliente que generalmente tienen pelaje o pelo, que dan a luz descendencia viva, y que alimentan a su descendencia con leche. Los mamíferos incluyen seres humanos; animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos); animales de granja (por ejemplo, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras); animales salvajes; y similares. En una realización, el mamífero es una hembra. En una realización, el mamífero es una hembra humana. En una realización, el mamífero es un perro o un gato. En una realización, el mamífero es un mamífero diabético, por ejemplo, un ser humano que tiene diabetes de tipo 2. En una realización, el mamífero es un mamífero diabético obeso, por ejemplo, un mamífero obeso que tiene diabetes de tipo 2. El término “sujeto” en el contexto de métodos descritos en el presente documento se refiere a un mamífero.

“Fragmento” en el contexto de polipéptidos se refiere en el presente documento en el sentido químico habitual a una parte de un polipéptido. Por ejemplo, un fragmento puede resultar de delección N terminal o C terminal de uno o más restos de un polipéptido parental, y/o un fragmento puede resultar de la delección interna de uno o más restos de un polipéptido parental. “Fragmento” en el contexto de un anticuerpo se refiere a una parte de un anticuerpo que puede unirse con una molécula biológicamente activa para modular la solubilidad, la distribución dentro de un sujeto, y similares. Por ejemplo, la exendina-4(1-30) describe un fragmento biológicamente activo de exendina-4 en el que la “cola” C terminal de exendina de los aminoácidos 31-19 se suprimen. El término “parental” en el contexto de polipéptidos se refiere, en el sentido habitual, a un polipéptido que actúa como una estructura de referencia antes de la modificación, por ejemplo, inserción, delección y/o sustitución. El término “conjugado” en el contexto de polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento se refiere a enlace covalente entre polipéptidos componentes, por ejemplo, ABD, HD1 y similares. El término “fusión” en el contexto de polipéptidos modificados genéticamente en el presente documento se refiere a enlace covalente entre polipéptidos componentes, por ejemplo, ABD, HD1 y similares, mediante uno o ambos de grupo amino o carboxilo terminal funcional de la cadena principal peptídica. Los polipéptidos modificados genéticamente pueden realizarse de forma sintética o recombinante. Típicamente, se realizan fusiones usando biotecnología recombinante, sin embargo, también puede realizarse por métodos de síntesis química y conjugación.

“Análogo” como se usa en el presente documento en el contexto de polipéptidos se refiere a un compuesto que tiene inserciones, delecciones y/o sustituciones de aminoácidos en relación con un compuesto parental. “Secuencia análoga” como se usa en el presente documento en el contexto de polipéptidos se refiere a una secuencia de

aminoácidos que tiene inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos en relación con una secuencia de aminoácidos parental (por ejemplo, secuencia de tipo silvestre, secuencia nativa). Un análogo puede tener estabilidad, solubilidad, eficacia, semivida y similares superiores. En algunas realizaciones, un análogo es un compuesto que tiene al menos 50 %, por ejemplo 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % 98 % o incluso más, de identidad de secuencia con el compuesto parental. En una realización preferida, el análogo tiene de 1 a 5 modificaciones de aminoácidos seleccionadas de forma independiente de una cualquiera o una combinación de una inserción, deleción, adición y sustitución. En cualquiera de las realizaciones del presente documento, el análogo de exendina puede tener de 1 a 5 modificaciones de aminoácidos seleccionadas de forma independiente de una cualquiera o una combinación de una inserción, deleción, adición y sustitución, y preferentemente conservar al menos 50 %, por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o incluso más, de identidad de secuencia con el compuesto parental, y aún más preferentemente al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o aún más de identidad de secuencia con el compuesto parental, y preferentemente el compuesto parental es exendina-4, exendina-4(1-38), exendina-4(1-37), exendina-4(1-36), exendina-4(1-35), exendina-4(1-34), exendina-4(1-33), exendina-4(1-32), exendina-4(1-31), exendina-4(1-30), exendina-4(1-29) o exendina-4(1-28), y más preferentemente, el compuesto parental tiene la secuencia de exendina-4. En una realización al menos los aminoácidos correspondientes a las posiciones 1, 4, 6, 7 y 9 de exendina-4 son los de la exendina-4 nativa, y además las una a cinco modificaciones son sustituciones de aminoácidos conservativas en posiciones distintas de las posiciones 1, 4, 6, 7 y 9 de exendina-4. Por ejemplo, en una realización adicional más de las realizaciones del presente documento, un análogo de exendina conserva el aminoácido al menos como se encuentra en la posición 3, 4, 6, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 18, 19, 22, 23, 25, 26 y/o 30 de la exendina-4, y, preferentemente además no tiene más de 1 a 5 de las posiciones restantes sustituidas con otro aminoácido, más preferentemente un aminoácido químicamente conservativo. En todos los análogos del presente documento, cualquier sustitución o modificación en las posiciones 1 y/o 2 conservarán la resistencia a escisión por DPP-IV conservando o mejorando al mismo tiempo la actividad insulínica como se conoce en la técnica para análogos de exendina-4, tales como desaminohistidil-exendina-4. Como es habitual en la técnica, el término "conservativo" en el contexto de sustituciones de aminoácidos se refiere a sustitución que mantiene las propiedades del tipo de carga (por ejemplo, aniónica, catiónica, neutra, polar y similares), hidrofobicidad o hidrofilia, volumen (por ejemplo, contactos de van der Waals y similares) y/o funcionalidad (por ejemplo, hidroxilo, amino, sulfhidrilo y similares). La expresión "no conservativa" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no es conservativa.

"Identidad", "identidad de secuencia" y similares en el contexto de la comparación de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente 50 % de identidad, preferentemente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad sobre una región específica, cuando se comparan y se alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación o región designada) como se mide usando algoritmos de comparación de secuencias conocidos en la técnica, por ejemplo, BLAST o BLAST 2.0. Esta definición incluye secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como las que tienen sustituciones, así como de origen natural, por ejemplo, variantes polimórficas o alélicas, y variantes realizadas por el hombre. Como se sabe en la técnica, en algoritmos preferidos, se tienen en cuenta huecos y similares. Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias si es necesario, y se designan parámetros de programas de algoritmo de secuencia. Preferentemente, pueden usarse parámetros de programas por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por alineamiento manual e inspección visual. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds. 1995 suplemento). Los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, 1977, *Nuci. Acids Res.* 25: 3389-3402 y Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Se usan BLAST y BLAST 2.0, como se conocen en la técnica, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y las proteínas descritos en el presente documento. Está públicamente disponible software para realizar análisis de BLAST a través del sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica. Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden con o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul *et al.*, misma referencia). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, por ejemplo, para secuencias de nucleótidos, los

parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos desapareados, siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada cae en la cantidad X de su valor obtenido máximo; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza al final de una de las secuencias. Los parámetros de algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

El término "aproximadamente" en el contexto de un valor numérico se refiere a +/-10 % del valor numérico.

Los términos "péptido" y "polipéptido" en el contexto de componentes de los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento son sinónimos.

II. Compuestos

En un primer aspecto, se describen compuestos polipeptídicos modificados genéticamente con secuencia que incluye una secuencia polipeptídica de dominio de unión albúmina (ABD) y al menos una secuencia de dominio de la hormona polipeptídica (HD1). Las expresiones "dominio de unión a albúmina", "ABD" y similares se refieren a polipéptidos capaces de unirse con albúmina como se describe en el presente documento. Las expresiones "dominio de hormona", "polipéptido de dominio de hormona" y similares se refieren a un polipéptido agonista del receptor de GP-1 capaz de inducir una respuesta biológica en un sujeto. Los dominios de hormonas ejemplares incluyen, pero sin limitación, una exendina, un fragmento de exendina o un análogo de exendina.

Se descubrió sorprendentemente que una exendina, un análogo de exendina o un fragmento activo pueden fusionarse con un dominio de unión a albúmina (ABD) de muy alta afinidad derivado de los dominios de unión a albúmina de la proteína G bacteriana de la cepa de *Streptococcus* G148, conservando al mismo tiempo suficiente actividad biológica de exendina-4 y teniendo una duración de la acción extendida, por ejemplo de al menos 3 días e incluso 5 días en un roedor, lo que se traduce a al menos una semana de duración o más en un sujeto humano. La "duración de acción" se refiere en el sentido habitual a permitir una dosificación más infrecuente en un régimen terapéutico. Por lo tanto, una duración de acción prolongada permitirá programas de dosificación menos frecuentes y/o más convenientes. Esto era sorprendente en parte porque no se ha demostrado exhaustivamente que dichos péptidos ABD sean una plataforma robusta como un vehículo proteico terapéutico, son relativamente hidrófobos lo que podría interaccionar de forma adversa con un péptido terapéutico unido y no pudieron actuar como un vehículo para al menos una familia de hormonas peptídicas. Específicamente, la amilina de rata cuando se conjuga o fusiona con los ABD descritos en el presente documento no presentó ninguna actividad significativa o de acción larga *in vivo* en los mismos modelos de roedor en los que se descubrió que diversas construcciones de exendina-ABD estaban activas y con duración de acción larga.

Componentes biológicamente activos. Los componentes de compuestos biológicamente activos contemplados para su uso en los compuestos y métodos descritos en el presente documentos incluyen las exendinas. La expresión "compuesto biológicamente activo" y similares se refiere en el sentido habitual a compuestos, por ejemplo, polipéptidos y similares, que pueden inducir una respuesta biológica.

Exendinas. Las exendinas son péptidos que se encuentran en las secreciones salivares del monstruo de Gila y el Lagarto Moteado Mejicano, reptiles que son endógenos de Arizona y el norte de México. La exendina-3 está presente en las secreciones salivares de *Heloderma horridum* (Lagarto Moteado Mejicano), y exendina-4 está presente en las secreciones salivares de *Heloderma suspectum* (monstruo de Gila). Véase Eng *et al*, 1990, J. Biol. Chem., 265: 20259-62; Eng *et al*, 1992, J. Biol. Chem., 267: 7402-7405. Las secuencias de exendina-3 y exendina-4, respectivamente, se presentan a continuación:

HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEC ID N°: 1);
HGETFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEC ID N°: 2).

Hargrove *et al*. (Regulatory Peptides, 2007, 141: 113-119) presentaron un análogo peptídico de exendina-4 que es un análogo peptídico de exendina-4 amidado en el extremo C terminal de longitud completa con una diferencia de un único nucleótido en la posición 14 en comparación con la exendina-4 nativa. La secuencia de [¹⁴Leu]Exendina-4 es la siguiente: HGETFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEC ID N°: 3). Otro análogo peptídico de exendina-4 es una quimera de los primeros 32 aminoácidos de exendina-4 que tiene sustituciones de aminoácidos en las posiciones 14 y 28 seguidas de una secuencia de 5 aminoácidos del extremo C terminal de un GLP1 no mamífero (de rana): [Leu¹⁴,Gln²⁸]Exendina-4(1-32)-fGrLP-1(33-37). Este compuesto tiene la siguiente secuencia: HGETFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLQGGPSKEIIS (SEC ID N°: 4). También se conocen en la técnica forma biológicamente activas, truncadas en el extremo C terminal, de exendina-4, tales como exendina-4(1-28),

exendina-4(1-29), exendina-4(1-30), exendina-4(1-31), exendina-4(1-32) y sus formas amidadas. Todos estos análogos de exendina son adecuados como componentes de los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento. Como es habitual en la técnica, los corchetes (es decir, “[]”) en un nombre de compuesto peptídico indica sustitución del resto o elemento químico dentro de los corchetes. Por ejemplo, [¹⁴Leu]Exendina-4, [¹⁴Leu]Ex-4, y similares se refieren a exendina-4 que tienen leucina en la posición 14. La posición numérica de un aminoácido puede indicarse por números antepuestos o pospuestos en una diversidad de formas empleadas de forma rutinaria en la técnica. Por ejemplo, los términos ¹⁴Leu, Leu14, 14Leu, Leu¹⁴ y similares, son sinónimos en su referencia a leucina en la posición 14.

Se entiende que en algunas realizaciones puede estar presente una amida C terminal u otro resto de protección del extremo C terminal en compuestos descritos en el presente documento.

Aunque las exendinas tienen algo de similitud de secuencia con varios miembros de la familia del péptido de tipo glucagón, siendo la mayor homología, 53 %, para GLP-1 (7-36)NH₂ (Goke *et al*, 1993, J. Biol. Chem., 268: 19650-55) [secuencia de GLP-1 7-37)NH₂: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEC ID N°: 5)], también denominado en ocasiones “GLP-1”) que tiene un efecto insulínico que estimula la secreción de insulina desde células beta pancreáticas, las exendinas no son homólogos de GLP-1.

Los estudios farmacológicos han conducido a informes de que la exendina-4 puede actuar en receptores de GLP-1 *in vitro* en ciertas células secretoras de insulina, sin embargo, también se ha indicado que la exendina-4 puede actuar en receptores sobre los que no actúa GLP-1. Además, la exendina-4 comparte algunas pero no todas de las propiedades biológicas *in vivo* con GLP-1 y tiene una duración de acción significativamente más larga que GLP-1. Basándose en sus actividades insulínicas, se ha propuesto el uso de la exendina-3 y exendina-4 para el tratamiento de diabetes mellitus y la prevención de hiperglucemia (Eng, Patente de Estados Unidos n.º 5.424.286), y, de hecho, la exendina-4 se ha aprobado en los Estados Unidos y en Europa para su uso como un producto terapéutico para tratar diabetes de tipo 2.

De hecho, se cree que las exendinas no son el homólogo de especie de GLP-1 de mamífero como se ha indicado por Chen y Drucker que clonaron el gen de exendina del monstruo de Gila (J. Biol. Chem. 272: 4108-15 (1997)). La observación de que el monstruo de Gila también tiene genes separados para proglucagones (a partir de los que se procesa GLP-1), que son más similares al proglucagón de mamífero que la exendina, indicó que las exendinas no son meramente homólogos de especie de GLP-1.

Se describen métodos para regular la movilidad gastrointestinal usando agonistas de exendina en la Patente de Estados Unidos n.º 6.858.576 (es decir, basándose en la solicitud de Estados Unidos n.º de serie 08/908.867 presentada el 8 de agosto de 1997, que es una continuación en parte de la solicitud de Estados Unidos n.º de serie 08/694.954 presentada el 8 de agosto de 1996). Se describen métodos para reducir el consumo de alimentos usando agonistas de exendina en la Patente de Estados Unidos n.º 6.956.026 (es decir, basándose en la solicitud de Estados Unidos n.º de serie 09/003.869, presentada el 7 de enero de 1998, que reivindica el beneficio de la solicitud de Estados Unidos n.º 60/034.905 presentada el 7 de enero de 1997, 60/055.404 presentada el 7 de agosto de 1997, 60/065.442 presentada el 14 de noviembre de 1997 y 60/066.029 presentada el 14 de noviembre de 1997).

Se describen secuencias de compuestos agonistas de exendina nuevos útiles en los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento en el documento WO 99/07404 (es decir, documento PCT/US98/16387 presentado el 6 de agosto de 1998), en el documento WO 99/25727 (es decir, documento PCT/US98/24210, presentado el 13 de noviembre de 1998), en el documento WO 99/25728 (es decir, documento PCT/US98/24273, presentado el 13 de noviembre de 1998), en el documento WO 99/40788, en el documento WO 00/41546, y en el documento WO 00/41548. Se describen en el presente documento métodos para ensayar con respecto a actividades de exendina *in vitro* e *in vivo*, como se conoce en la técnica, incluyendo actividad insulínica, de inhibición de consumo de alimentos y actividad de pérdida de peso, y también en las referencias anteriores y otras referencias enumeradas en el presente documento.

Ciertas exendinas ejemplares, agonistas de exendina y agonistas de análogos de exendina incluyen: fragmentos de exendina exendina-4 (1-30) (His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly); exendina-4(1-28), exendina-4(1-29), exendina-4(1-30), exendina-4(1-31) y exendina-4(1-32). Los análogos incluyen sustitución en la posición ¹⁴Met (es decir, ¹⁴Met) con un aminoácido no oxidante tal como leucina. Los ejemplos incluyen [¹⁴Leu]exendina-4, [¹⁴Leu]exendina-4(1-30), [¹⁴Leu]exendina-4(1-28) y [¹⁴Leu, ²⁵Phe]exendina-4.

Los agonistas de análogos de exendina para uso en los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 7.223.725; tales como compuestos de la fórmula: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Gly Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Ala Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ Xaa₂₂ Xaa₂₃ Xaa₂₄ Xaa₂₅ Xaa₂₆ Xaa₂₇ Xaa₂₈-Z₁; en la que Xaa₁ es His, Arg o Tyr; Xaa₂ es Ser, Gly, Ala o Thr; Xaa₃ es Ala, Asp o Glu; Xaa₅ es Ala o Thr; Xaa₆ es Ala, Phe, Tyr; Xaa₇ es Thr o Ser; Xaa₈ es Ala, Ser o Thr; Xaa₉ es Asp o Glu; Xaa₁₀ es Ala, Leu, Ile, Val, o Met; Xaa₁₁ es Ala o Ser; Xaa₁₂ es Ala o Lys; Xaa₁₃ es Ala o Gln; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ile, Val o Met; Xaa₁₅ es Ala o Glu; Xaa₁₆ es Ala o Glu; Xaa₁₇ es Ala o Glu; Xaa₁₉ es Ala o Val;

Xaa₂₀ es Ala o Arg; Xaa₂₁ es Ala o Leu; Xaa₂₂ es Ala, Phe, Tyr; Xaa₂₃ es Ile, Val, Leu, o Met; Xaa₂₄ es Ala, Glu o Asp; Xaa₂₅ es Ala, Trp, Phe, Tyr; Xaa₂₆ es Ala o Leu; Xaa₂₇ es Ala o Lys; Xaa₂₈ es Ala o Asn; Z₁ es -OH, -NH₂, Gly-Z₂, Gly Gly-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇-Z₂ o Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈-Z₂; Xaa₃₁, Xaa₃₆, Xaa₃₇ y Xaa₃₈ son independientemente Pro o están ausentes; y Z₂ es -OH o -NH₂. En todos y cada uno de los análogos de exendina descritos anteriormente, también se contemplan específicamente en los que se realiza un reemplazo para la histidina correspondiente a Xaa1 con cualquiera de D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, N-alfa-acetil-histidina, alfa-fluorometil-histidina, alfa-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, 4-piridilalanina, 4-imidazoacetilo, des-amino-histidilo (imidazopropionilo), beta-hidroxi-imidazopropionilo, N-dimetil-histidilo o beta-carboxi-imidazopropionilo. Se contemplan además específicamente en el presente documento análogos de exendina descritos en el presente documento en los que se realiza un reemplazo para la glicina en Xaa2 con cualquiera de D-Ala, Val, Leu, Lys, Aib, ácido (1-amino ciclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-amino ciclooctil)carboxílico.

De acuerdo con una realización, los compuestos ejemplares incluyen los de la fórmula anterior en los que: Xaa₁ es His o Arg; Xaa₂ es Gly o Ala; Xaa₃ es Asp o Glu; Xaa₅ es Ala o Thr; Xaa₆ es Ala o Phe; Xaa₇ es Thr o Ser; Xaa₈ es Ala, Ser o Thr; Xaa₉ es Asp o Glu; Xaa₁₀ es Ala, o Leu; Xaa₁₁ es Ala o Ser; Xaa₁₂ es Ala o Lys; Xaa₁₃ es Ala o Gln; Xaa₁₄ es Ala o Leu; Xaa₁₅ es Ala o Glu; Xaa₁₆ es Ala o Glu; Xaa₁₇ es Ala o Glu; Xaa₁₉ es Ala o Val; Xaa₂₀ es Ala o Arg; Xaa₂₁ es Ala o Leu; Xaa₂₂ es Phe; Xaa₂₃ es Ile, Val; Xaa₂₄ es Ala, Glu o Asp; Xaa₂₅ es Ala, Trp o Phe; Xaa₂₆ es Ala o Leu; Xaa₂₇ es Ala o Lys; Xaa₂₈ es Ala o Asn; Z₁ es -OH, -NH₂, Gly-Z₂, Gly Gly-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇-Z₂, Gly Gly Xaa₃₁ Ser Ser Gly Ala Xaa₃₆ Xaa₃₇ Xaa₃₈-Z₂; Xaa₃₁, Xaa₃₆, Xaa₃₇ y Xaa₃₈ que son independientemente Pro o están ausentes y Z₂ que es -OH o -NH₂; siempre que no más de tres de Xaa₃, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₈, Xaa₁₀, Xaa₁₁, Xaa₁₂, Xaa₁₃, Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇, Xaa₁₉, Xaa₂₀, Xaa₂₁, Xaa₂₄, Xaa₂₅, Xaa₂₆, Xaa₂₇ y Xaa₂₈ sean Ala. En todos y cada uno de los análogos de exendina descritos anteriormente, también se contemplan específicamente en los que se realiza un reemplazo para la histidina correspondiente a la posición Xaa1 con cualquiera de D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, N-alfa-acetil-histidina, alfa-fluorometil-histidina, alfa-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, 4-piridilalanina, 4-imidazoacetilo, des-amino-histidilo (imidazopropionilo), beta-hidroxi-imidazopropionilo, N-dimetil-histidilo o beta-carboxi-imidazopropionilo. Se contemplan además específicamente en el presente documento análogos de exendina descritos en el presente documento en los que se realiza un reemplazo para la glicina en Xaa2 con cualquiera de D-Ala, Val, Leu, Lys, Aib, ácido (1-amino ciclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-amino ciclooctil)carboxílico.

Otros compuestos ejemplares incluyen los expuestos en el documento WO 99/25727 identificados en el mismo como compuestos 2-23. De acuerdo con otra realización, se proporcionan compuestos en los Xaa₁₄ es Leu, Ile o Val más preferentemente Leu y/o Xaa₂₅ es Trp, Phe o Tyr, más preferentemente Trp o Phe. Estos compuestos serán menos susceptibles de degradación oxidativa, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como durante la síntesis del compuesto.

Los ejemplos adicionales de análogos de exendina adecuados para su uso en los presentes polipéptidos de fusión incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos 6528486 publicada el 4 de marzo de 2003. Específicamente, los análogos de exendina incluyen los que consisten en una exendina o un análogo de exendina que tiene al menos 90 % de homología con exendina-4 que tienen opcionalmente entre una y cinco deleciones en las posiciones 34-39, y una extensión C terminal de una secuencia peptídica de 4-20 unidades de aminoácidos unidas covalentemente con dicha exendina en los que cada unidad de aminoácido en dicha secuencia de extensión peptídica se selecciona del grupo que consiste en Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His y Met. Más preferentemente la extensión es una secuencia peptídica de 4-20 restos de aminoácidos, por ejemplo, en el intervalo de 4-15, más preferentemente en el intervalo de 4-10, en particular en el intervalo de 4-7 restos de aminoácidos, por ejemplo, de 4, 5, 6, 7, 8 o 10 restos de aminoácidos, en los que se prefieren 6 restos de aminoácidos. Más preferentemente, de acuerdo con la Patente de Estados Unidos 6528486 el péptido de extensión contiene al menos un resto de Lys y es aún más preferentemente de 3 a 7 lisinas y aún más preferentemente 6 lisinas.

Por ejemplo, un análogo es HGEFTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNNG PSSGAPP SKKKKKK (SEC ID N°: 118) (también denominado ([des-³⁶Pro]exendina-4(1-39)-Lys₆). Los análogos ejemplares adicionales incluyen Lys₆-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-(Lys)₆ (H-Lys₆-des Pro³⁶exendina-4(1-39)-Lys₆) (SEC ID N°: 184); His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser (H-[des³⁶Pro, ^{37,38}Pro]exendina-4(1-39)-NH₂) (SEC ID N°: 185); Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser (H-(Lys)₆-[des³⁶Pro, ^{37,38}Pro]exendina-4(1-39)) (SEC ID N°: 186); Asn-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser (H-Asn-(Glu)₅-[des³⁶Pro, ^{37,38}Pro]exendina-4(1-39))

(SEC ID N°: 187); His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)₆[(des ³⁶Pro, ^{37,38}Pro]exendina-4(1-39)-(Lys)₆ (SEC ID N°: 188); (Lys)₆-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)₆ (H-(Lys)₆[(des ³⁶Pro, ^{37,38}Pro]exendina-4(1-39)-(Lys)₆) (SEC ID N°: 189); y Asp-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-(Lys)₆ (Asn-(Glu) 5-[des ³⁶Pro, ^{37,38}Pro]exendina-4(1-39)-(Lys)₆) (SEC ID N°: 190). Como es habitual en la técnica, la repetición de un aminoácido puede indicarse por un número en subíndice que expone el número de repeticiones; es decir, Lys₆, (Lys)₆ y similares se refieren a hexalilisilo (SEC ID N°: 191). En todos y cada uno de los análogos de exendina descritos anteriormente, se contemplan específicamente en los que se realiza un reemplazo para la histidina correspondiente a la posición 1 con cualquiera de D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, N-alfa-acetil-histidina, alfa-fluorometil-histidina, alfa-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, 4-piridilalanina, 4-imidazoacetilo, des-amino-histidilo (o imidazopropionilo), beta-hidroxi-imidazopropionilo, N-dimetil-histidilo o beta-carboxi-imidazopropionilo. Se contemplan además específicamente en el presente documento análogos de exendina descritos en el presente documento en los que se realiza un reemplazo para la glicina en la posición 2 con cualquiera de D-Ala, Val, Leu, 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.

Son ejemplos adicionales de análogos de exendina adecuados para su uso en las construcciones polipeptídicas modificadas genéticamente los descritos en la solicitud de PCT publicada WO2004035623, particularmente los comprendidos por aminoácidos de origen natural, que describen análogos de exendina que tienen al menos un resto de aminoácido modificado particularmente en las posiciones ¹³Gln, ¹⁴Met, ²⁵Trp o ²⁸Asn con referencia a las posiciones correspondientes de exendina-4 (1-39). De acuerdo con esa publicación son adicionales análogos tales que comprenden además una extensión C terminal de 1-7 aminoácidos que comprende al menos un aminoácido Lys y más preferentemente al menos cinco unidades de aminoácidos Lys tales como seis o siete unidades de aminoácidos Lys.

Son más ejemplos adicionales de análogos de exendina adecuados para su uso en las construcciones polipeptídicas modificadas genéticamente los descritos en la solicitud de PCT publicada WO/2010/120476, titulada "N-Terminus Conformationally Constrained GLP-1 Receptor Agonist Compounds", que describe análogos de exendina que tienen restos de aminoácidos modificados en la parte N terminal de una exendina o un análogo de exendina para crear una característica de giro beta alta en esa región. Por ejemplo, se diseñan análogos para imitar restos de aminoácidos His1 Gly2 Glu3 creando una región restringida conformacionalmente, incluyen análogos de exendina que contienen un peptidomimético de tiazolidina-prolina en His1 Gly2 Glu3 (véase por ejemplo compuestos descritos en las Figuras 17A-F en la misma), que pueden usarse como una modificación en exendina-4, lixisenatida u otros análogos descritos en el presente documento.

En todas y cada una de las exendinas, los análogos de exendina y las fórmulas descritas en el presente documento se contemplan específicamente en los que se realiza un reemplazo para la histidina correspondiente a la posición 1 con cualquiera de L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, N-alfa-acetil-histidina, alfa-fluorometil-histidina, alfa-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, 4-piridilalanina, 4-imidazoacetilo, des-amino-histidilo (imidazopropionilo), beta-hidroxi-imidazopropionilo, N-dimetil-histidilo o beta-carboxi-imidazopropionilo. Por ejemplo, son análogos de exendina preferidos para su uso en conjugados polipeptídicos modificados genéticamente como se describen en el presente documento en los que la posición His1 está modificada (4-imidazoacetil) exendina-4, (des-amino-histidil) exendina-4 (o (imidazopropionil) exendina-4), (beta-hidroxi-imidazopropionil) exendina-4, (N-dimetil-histidil) exendina-4 y (beta-carboxi-imidazopropionil) exendina-4. Se contemplan además específicamente en el presente documento exendinas o análogos de exendina descritos en el presente documento en los que se realiza un reemplazo para la glicina en la posición 2 con cualquiera de D-Ala, Val, Leu, Lis, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-amino ciclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico.

Cualquiera de los análogos de exendina anteriores o sus fragmentos activos son adecuados para su uso en los presentes polipéptidos modificados genéticamente, con o sin un enlazador para el ABD.

Péptidos de dominio de unión a albúmina (ABD). Son péptidos de dominio de unión a albúmina (ABD) para su uso en la invención los que tienen afinidad comparativamente alta por albúmina y derivan de dominios de unión a albúmina de la proteína G bacteriana de la cepa de *Streptococcus* G148. Como tales, los péptidos de ABD contemplados para los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento incluyen los que tienen los motivos de unión a albúmina como se describen en Jonsson *et al.* (Protein Eng. Design & Selection, 2008, 21: 515-527) así como los péptidos de ABD descritos en el mismo, y los motivos y péptidos de ABD descritos adicionalmente en la Solicitud Publicada de PCT n.º WO2009/016043, así como análogos de los mismos, particularmente los que tienen al menos 85 % de identidad de aminoácidos. En una realización el péptido de ABD puede incluir un motivo de unión a albúmina ("ABM") que incluye la secuencia de aminoácidos GVSD X₅ YK X₈ X₉ I X₁₁ X₁₂ A X₁₄ TVEGV X₂₀ AL X₂₃ X₂₄ X₂₅ I (SEC ID N°: 119)

en la que, independientemente entre sí,

X_5 se selecciona de Y y F;

X_8 se selecciona de N, R y S;

X_9 se selecciona de V, I, L, M, F e Y;

5 X_{11} se selecciona de N, S, E y D;

X_{12} se selecciona de R, K y N;

X_{14} se selecciona de K y R;

X_{20} se selecciona de D, N, Q, E, H, S, R y K;

X_{23} se selecciona de K, I y T;

10 X_{24} se selecciona de A, S, T, G, H, L y D; y

X_{25} se selecciona de H, E y D.

Preferentemente, el péptido de ABD se une con albúmina con un valor de K_D de la interacción que es como máximo 1×10^{-6} M, y aún más preferentemente como máximo 1×10^{-9} M (afinidad incluso más estrecha). El término " K_D " se refiere a una constante de disociación, como es habitual en la técnica. Más preferentemente, el valor de K_D de la interacción que es como máximo 1×10^{-10} M, aún más preferentemente es como máximo 1×10^{-11} M, aún más preferentemente es como máximo 1×10^{-12} M, y aún más es como máximo 1×10^{-13} M. por ejemplo, un valor de K_D de 1×10^{-14} M es un valor de K_D de la interacción que es como máximo 1×10^{-13} M. Los valores de K_D pueden determinarse como se describe en la Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043, preferentemente para albúmina de suero humano. En una realización se contempla el género anterior a condición de que la secuencia de aminoácidos no sea GVSDDYYKNLNNAKTVEGVKALIDEI (SEC ID N.º: 120).

Como se demuestra en el presente documento y en las referencias citadas, la capacidad de unión a albúmina del péptido de ABD puede conservarse a pesar de cambios de aminoácidos siempre que dichos cambios conserven suficiente estructura terciaria del péptido ABD. Dichos cambios incluyen, por ejemplo, una sustitución en la que un resto de aminoácido que pertenece a cierto agrupamiento funcional de restos de aminoácidos (por ejemplo hidrófobos, hidrófilos, polares, etc.) se intercambia por otro resto de aminoácido del mismo grupo funcional. En consecuencia, en dicha realización del péptido de ABD, el motivo X_5 es Y. En una realización del ABD X_8 se selecciona de N y R, y puede ser en particular R. En una realización X_9 es L. En una realización X_{11} se selecciona de N y S, y puede ser en particular N. En una realización X_{12} se selecciona de R y K, tal como siendo X_{12} R o siendo X_{12} K. En una realización X_{14} es K. En una realización X_{20} se selecciona de D, N, Q, E, H, S y R, y puede ser en particular E. En una realización X_{23} se selecciona de K y I, y puede ser en particular K. En una realización X_{24} se selecciona de A, S, T, G, H y L. En una realización más específica X_{24} es L. En una realización aún más específica " $X_{23} X_{24}$ " es KL. En otra realización aún más específica " $X_{23} X_{24}$ " es TL. En una realización X_{24} se selecciona de A, S, T, G y H. En una realización más específica X_{24} se selecciona de A, S, T, G y H y X_{23} es I. En una realización X_{25} es H.

En general, las secuencias de motivos de unión a albúmina individuales dentro de la fórmula anterior incluyen las presentadas como SEC ID N.º: 1-257 en la Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043. En ciertas realizaciones del polipéptido de unión a albúmina el motivo de unión a albúmina consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N.º: 1-257. En una realización más específica, la secuencia del motivo se selecciona de SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 3, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 15, SEC ID N.º: 25, SEC ID N.º: 27, SEC ID N.º: 46, SEC ID N.º: 49, SEC ID N.º: 53, SEC ID N.º: 54, SEC ID N.º: 55, SEC ID N.º: 1 55, SEC ID N.º: 239, SEC ID N.º: 240, SEC ID N.º: 241, SEC ID N.º: 242, SEC ID N.º: 243, SEC ID N.º: 244 y SEC ID N.º: 245 de la Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043. En aún más realizaciones específicas, la secuencia de motivos se selecciona de SEC ID N.º: 3, SEC ID N.º: 53 y SEC ID N.º: 239 de la Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043. Se describen adicionalmente en el presente documento polipéptidos de unión a albúmina, que contienen estos motivos de unión a albúmina y por lo tanto son adecuados para la conjugación o fusión con un dominio hormonal como se describe en el presente documento y posteriormente y se ejemplifica en la Tabla 1 y los Ejemplos. Sin desear quedar ligado a la teoría se cree que el motivo de unión a albúmina puede formar parte de un dominio proteico de haz de tres hélices. Por ejemplo, el motivo puede constituir esencialmente o formar parte de dos hélices alfa con un bucle de interconexión, dentro del dominio proteico de haz de tres hélices. En consecuencia, en realizaciones particulares, dicho dominio proteico de haz de tres hélices se selecciona del grupo de dominios de tres hélices de la proteína G receptora bacteriana de la cepa de *Streptococcus* G148. En diferentes variantes de esta realización, el dominio proteico de haz de tres hélices del que el motivo forma parte se selecciona del grupo de dominio GA1, dominio GA2 y dominio GA3 de la proteína G de la cepa de *Streptococcus* G148, en particular el dominio GA3.

En realizaciones en las que el motivo "forma parte de un dominio proteico de haz de tres hélices", se entiende que esto significa que la secuencia del motivo de unión a albúmina está "insertada" en o "injerada" en o "fusionada" con la secuencia del dominio de haz de tres hélices de origen natural (o de otro modo original), de modo que el motivo reemplaza un motivo estructural similar en el dominio original. Por ejemplo y sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que el motivo constituye dos de las tres hélices de un haz de tres hélices, y puede reemplazar dicho motivo de dos hélices dentro de cualquier haz de tres hélices. El reemplazo de dos hélices del dominio de haz de tres hélices por las dos hélices de motivo desveladas en el presente documento se realiza para no afectar a la estructura básica del polipéptido. Es decir, el plegamiento general de la cadena principal del polipéptido de acuerdo con esta realización será sustancialmente igual que el del dominio proteico de haz de tres hélices del que forma parte, por

ejemplo que tiene los mismos elementos de estructura secundaria en el mismo orden etc. Por lo tanto, un motivo útil para los polipéptidos modificados genéticamente en el presente documento puede “formar parte” de un dominio de haz de tres hélices si el polipéptido de acuerdo con esta realización tiene el mismo pliegue que el dominio original, lo que implica que las propiedades estructurales básicas se comparten, dando como resultado esas propiedades, por ejemplo, espectros de DC similares.

En consecuencia, en una realización el polipéptido de dominio de unión a albúmina es un dominio proteico de haz de tres hélices, que incluye el motivo de unión a albúmina como se ha definido anteriormente y secuencias adicionales que componen el resto de la configuración de tres hélices. Con dicho polipéptido de dominio de unión a albúmina puede fusionarse una exendina o análogos o fragmentos activos de la misma para crear los polipéptidos modificados genéticamente como se describen en el presente documento. Un polipéptido de dominio de unión a albúmina adecuado para conjugación o fusión con un compuesto de exendina puede incluir la secuencia de aminoácidos: LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY (SEC ID N^o: 182) unido covalentemente con un motivo de unión a albúmina (ABM) que se une adicionalmente de forma covalente con la secuencia de aminoácidos LAALP (SEC ID N^o: 183), en el que ABM es un motivo de unión a albúmina como se define en el presente documento, X_a se selecciona de V y E; X_b se selecciona de L, E y D; X_c se selecciona de N, L e I; X_d se selecciona de R y K; y X_e se selecciona de D y K. En algunas realizaciones, un polipéptido de dominio de unión a albúmina adecuado para conjugación o fusión con un compuesto de exendina es la secuencia de aminoácidos: LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY (SEC ID N^o: 182) que se une covalentemente con un motivo de unión a albúmina (ABM) que se une covalentemente adicionalmente con la secuencia de aminoácidos LAALP (SEC ID N^o: 183), como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, el polipéptido de dominio de unión a albúmina incluye la secuencia de aminoácidos LAEAK X_a X_b A X_c X_d EL X_e KY GVSD X₅ YK X₈ X₉ I X₁₁ X₁₂ A X₁₄ TVEGV X₂₀ AL X₂₃ X₂₄ X₂₅ I LAALP (SEC ID N^o: 121), en la que X_a se selecciona de V y E; X_b se selecciona de L, E y D; X_c se selecciona de N, L e I; X_d se selecciona de R y K; X_e se selecciona de D y K; X₅ se selecciona de Y y F; X₈ se selecciona de N, R y S; X₉ se selecciona de V, I, L, M, F e Y; X₁₁ se selecciona de N, S, E y D; X₁₂ se selecciona de R, K y N; X₁₄ se selecciona de K y R; X₂₀ se selecciona de D, N, Q, E, H, S, R y K; X₂₃ se selecciona de K, I y T; X₂₄ se selecciona de A, S, T, G, H, L y D; y X₂₅ se selecciona de H, E y D.

Además para cada una de las realizaciones del presente documento de la secuencia de ABD, la prolina C terminal (correspondiente a la posición 46 anterior) puede estar opcionalmente ausente. Aún más para cada realización de la secuencia de ABD, la leucina en la posición 45 puede estar opcionalmente presente o ausente. “Secuencia de ABD” es una secuencia de un compuesto de ABD que es monovalente o divalente, según sea apropiado, que forma parte de un polipéptido modificado genéticamente desvelado en el presente documento. La “secuencia de dominio de hormona peptídica (HD1)” es una secuencia de un compuesto de dominio de hormona peptídica (HD1) que es monovalente o divalente, según sea apropiado, que forma parte de un polipéptido modificado genéticamente desvelado en el presente documento. La “secuencia de exendina” es una secuencia de un compuesto de exendina que es monovalente o divalente, según sea apropiado, que forma parte de un polipéptido modificado genéticamente desvelado en el presente documento. La “secuencia de análogo de exendina” es una secuencia de un compuesto análogo de exendina que es monovalente o divalente, según sea apropiado, que forma parte de un polipéptido modificado genéticamente desvelado en el presente documento. La “secuencia de fragmento activo de exendina” es una secuencia de un compuesto de fragmento activo de exendina que es monovalente o divalente, según sea apropiado, que forma parte de un polipéptido modificado genéticamente desvelado en el presente documento. La “secuencia de fragmento activo análogo de exendina” es una secuencia de un compuesto del fragmento activo análogo de exendina que es monovalente o divalente, según sea apropiado, que forma parte de un polipéptido modificado genéticamente desvelado en el presente documento. La “secuencia de motivo de unión a albúmina (ABM)” es una secuencia de un ABM que es monovalente o divalente, según sea apropiado, que forma parte de un polipéptido modificado genéticamente desvelado en el presente documento. A no ser que se indique de otro modo, se entiende que cuando un polipéptido modificado genéticamente “comprende” un compuesto (por ejemplo, un ABD o HD1), la secuencia del polipéptido modificado genéticamente incluye la secuencia del compuesto (por ejemplo una secuencia de ABD o una secuencia de HD1).

Debido a la presencia de un motivo de unión a albúmina, el péptido de ABD se une con albúmina con un valor de K_D de la interacción que es como máximo 1 x 10⁻⁶ M y aún más preferentemente como máximo 1 x 10⁻⁹ M (afinidad aún más estrecha). Más preferentemente el valor de K_D de la interacción que es como máximo 1 x 10⁻¹⁰ M, aún más preferentemente es como máximo 1 x 10⁻¹¹ M, aún más preferentemente es como máximo 1 x 10⁻¹² M, y aún más es como máximo 1 x 10⁻¹³ M. Los valores son más preferentemente para afinidad con albúmina de suero humano (“HSA”).

En una realización de este polipéptido de unión a albúmina X_a es V. En una realización de este polipéptido X_b es L. En una realización de este polipéptido X_c es N. En una realización de este polipéptido X_d es R. En una realización de este polipéptido X_e es D.

En ciertas realizaciones, X_a es E. En ciertas realizaciones X_b es D. En ciertas realizaciones, X_c es I. En ciertas realizaciones, X_d es K. En ciertas realizaciones, X_a de forma independiente es E, y/o de forma independiente X_b es D, y/o de forma independiente X_c es I, y/o de forma independiente X_d es K. En ciertas realizaciones, el polipéptido de

dominio de unión a albúmina es LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKRLISKAKTVEGVKALISEILAALP (SEC ID N°: 122). En ciertas realizaciones, el polipéptido de dominio de unión a albúmina es LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVVEALTHILAALP (SEC ID N°: 123). En ciertas realizaciones, el polipéptido de dominio de unión a albúmina es LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVVEALISEILAALP (SEC ID N°: 124).

Se presentan secuencias de polipéptidos de dominio de unión a albúmina individuales adecuados para fusión con los péptidos de dominio de hormona activos como se describe en el presente documento en Jonsson *et al.* (misma referencia) y como SEC ID N°: 258-514 en la Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043. Se desvelan secuencias seleccionadas en la Tabla 1 posterior. También está adaptado un polipéptido de unión a albúmina que tiene una secuencia de aminoácidos con 85 % o mayor identidad con una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 258-514. En realizaciones particulares, la secuencia del polipéptido de unión a albúmina se selecciona de SEC ID N°: 259, SEC ID N°: 260, SEC ID N°: 266, SEC ID N°: 272, SEC ID N°: 282, SEC ID N°: 284, SEC ID N°: 303, SEC ID N°: 306, SEC ID N°: 310, SEC ID N°: 311, SEC ID N°: 312, SEC ID N°: 412, SEC ID N°: 496, SEC ID N°: 497, SEC ID N°: 498, SEC ID N°: 499, SEC ID N°: 500, SEC ID N°: 501 y SEC ID N°: 502 en la Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043, y secuencias que tienen 85 % o más identidad con las mismas. En realizaciones más específicas de este aspecto de la invención, la secuencia del polipéptido de unión a albúmina se selecciona de SEC ID N°: 260, SEC ID N°: 310 y SEC ID N°: 496 en la Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043 y secuencias que tienen 85 % o mayor identidad con las mismas. En más realizaciones adicionales, la secuencia del polipéptido de unión a albúmina se selecciona de SEC ID N°: 260, SEC ID N°: 270, SEC ID N°: 272, SEC ID N°: 291, SEC ID N°: 294, SEC ID N°: 298, SEC ID N°: 299, SEC ID N°: 300, SEC ID N°: 400, SEC ID N°: 484, SEC ID N°: 485, SEC ID N°: 486, SEC ID N°: 487, SEC ID N°: 488, SEC ID N°: 489 y SEC ID N°: 490 en la Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043, y secuencias que tienen 85 % o mayor identidad con las mismas.

Las especies de ABD ejemplares descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, los compuestos con secuencia expuesta en la Tabla 1 a continuación y los Ejemplos. Véase también Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043. Una secuencia peptídica de ABD útil en compuestos, métodos y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede ser un fragmento o análogo de una secuencia peptídica de ABD desvelada en el presente documento o conocida en la técnica siempre que contenga una secuencia de motivo de unión a albúmina y se una con la albúmina con la afinidad descrita en el presente documento.

Tabla 1. Péptidos de ABD seleccionados

| Secuencia peptídica de ABD | SEC ID N°: |
|---|------------|
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP | 23 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYKSYINRAKTVEGVHTLIGHILAALP | 24 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYKRLINKAKTVEGVNALTHHILAALP | 25 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINRARTVEGVHALIDHILAALP | 26 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRAKHLHILAALP | 27 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYKLNINRAKTVEGVSSLKGHILAALP | 28 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVVEALTHILAALP | 29 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP | 30 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYKSYINRAKTVEGVHTLIGHILAALP | 31 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYKRLINKAKTVEGVNALTHHILAALP | 32 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINRARTVEGVHALIDHILAALP | 33 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRAKHLHILAALP | 34 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYKLNINRAKTVEGVSSLKGHILAALP | 35 |
| LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVVEALTHILAALP | 122 |
| LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVVEALTHILAALP | 123 |
| LAEAKEDAIKELDKYGVSDYYKNLINKAKTVEGVVEALISEILAALP | 124 |

Las expresiones "unión a albúmina" y "afinidad de unión por albúmina" como se usa en el presente documento se refieren a una propiedad de un polipéptido que puede ensayarse por ejemplo mediante el uso de tecnología de resonancia de plasmón superficial, tal como en un instrumento Biacore como se conoce en la técnica. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos posteriores, la afinidad de unión a albúmina puede ensayarse en un experimento en el que se inmoviliza albúmina, o un fragmento de la misma, en una microplaca sensora del instrumento, y la muestra que contiene el polipéptido para ensayar se pasa sobre la microplaca. Como alternativa, el polipéptido para ensayar se inmoviliza en una microplaca sensora del instrumento, y se pasa una muestra que contiene albúmina, o un fragmento de la misma, sobre la microplaca. La albúmina puede, a este respecto, ser una albúmina de suero de un mamífero, tal como albúmina de suero humano. El experto en la materia puede interpretar después los resultados obtenidos por dichos experimentos para establecer al menos una medida cualitativa de la afinidad de unión del polipéptido por la albúmina. Si se desea una medida cuantitativa, por ejemplo para determinar un valor de K_D para la interacción, también pueden usarse métodos de resonancia de plasmón superficial. Los valores de unión pueden definirse por ejemplo en un instrumento Biacore2000 (GE Healthcare). La albúmina se inmoviliza convenientemente

en una microplaca sensora de la medición, y las muestras del polipéptido cuya afinidad va a determinarse se preparan por dilución en serie y se inyectan. Después pueden calcularse los valores de K_D a partir de los resultados usando por ejemplo el modelo de unión de Langmuir 1:1 del software BIAevaluation 4.1 proporcionado por el fabricante del instrumento (GE Healthcare).

5 En una realización, el polipéptido de unión a albúmina de acuerdo con este aspecto se une con albúmina de modo que el valor de k_{off} de la interacción sea como máximo $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, tal como como máximo $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$.

10 En otra realización preferida del ABD usado en los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de la parte polipeptídica de unión a albúmina de un polipéptido modificado genéticamente incluye un ABD seleccionado de una cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento, incluyendo las de la Tabla 1 o el listado del presente documento e incluyendo además sus formas des-Pro46.

15 En una realización, el polipéptido de unión a albúmina de acuerdo con este aspecto incluye además uno o más restos de aminoácidos adicionales situados en el extremo N y/o C terminal de la secuencia de ABD definida o ejemplificada en el presente documento. Estos restos de aminoácidos adicionales pueden desempeñar un papel en la potenciación adicional de la unión de albúmina con el polipéptido, y la mejora de la estabilidad conformacional del dominio de unión a albúmina plegado, pero pueden igualmente cumplir bien otros fines, relacionados por ejemplo con uno o más de producción, purificación, estabilización *in vivo* o *in vitro*, acoplamiento, marcaje o detección del polipéptido, así como cualquier combinación de los mismos. Dichos restos de aminoácidos adicionales pueden incluir uno o más restos de aminoácidos añadidos para fines de acoplamiento químico, por ejemplo con el HD1.

25 Por ejemplo, los aminoácidos directamente precedentes o siguientes a la hélice alfa en el extremo N o C terminal de la secuencia de aminoácidos de ABD pueden por lo tanto en una realización afectar a la estabilidad conformacional. Un ejemplo de un resto de aminoácido que puede contribuir a estabilidad conformacional mejorada es un resto de serina situado en el extremo N terminal de la secuencia de aminoácidos de ABD como se ha definido anteriormente. El resto de serina N terminal puede en algunos casos formar una caja terminal S-X-X-E canónica, implicando enlace de hidrógeno entre el oxígeno gamma de la cadena lateral de serina y el NH de la cadena principal polipeptídica del resto de ácido glutámico. Esta protección N terminal puede contribuir a la estabilización de la primera hélice alfa del dominio de tres hélices que constituye el polipéptido de unión a albúmina de acuerdo con el primer aspecto de la divulgación.

35 Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos adicionales incluyen al menos un resto de serina en el extremo N terminal del polipéptido. La secuencia de aminoácidos de ABD está, en otras palabras, precedida por uno o más restos de serina. En otra realización del polipéptido de unión a albúmina, los aminoácidos adicionales incluyen un resto de glicina en el extremo N terminal de la secuencia de ABD. Se entiende que la secuencia de aminoácidos de ABD puede estar precedida por uno, dos, tres, cuatro o cualquier número adecuado de restos de aminoácidos. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de ABD puede estar precedida por un único resto de serina, un único resto de glicina o una combinación de los dos, tal como una combinación glicina-serina (GS) o una combinación glicina-serina-serina (GSS). Un ejemplo de dichos ABD que tiene una serina N terminal es SLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 176). La forma des-prolina correspondiente sería SLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL (SEC ID N°: 177).

45 En otra realización más, los restos de aminoácidos adicionales incluyen un ácido de alanina en el extremo N terminal del polipéptido de ABD definido en el presente documento, o en combinación con serina como una secuencia de alanina-serina en el extremo N terminal de las secuencias de ABD anteriores. En otra realización más, los restos de aminoácidos adicionales incluyen un ácido glutámico en el extremo N terminal del polipéptido de ABD definido en el presente documento.

50 De forma similar, la protección C terminal puede aprovecharse para mejorar la estabilidad de la tercera hélice alfa del dominio de tres hélices que constituye el polipéptido de unión a albúmina. El resto de prolina C terminal presente en el extremo C terminal de la secuencia de aminoácidos de ABD definida anteriormente puede actuar al menos parcialmente como un resto de protección terminal. Un resto de lisina después del resto de prolina en el extremo C terminal puede contribuir a estabilización adicional de la tercera hélice del polipéptido de unión a albúmina, mediante enlaces de hidrógeno entre el grupo amino épsilon del resto de lisina y los grupos carbonilo de los aminoácidos localizados dos y tres restos antes que la lisina en la cadena principal polipeptídica, por ejemplo los grupos carbonilo de los restos de leucina y alanina de la secuencia de aminoácidos de ABD definida anteriormente. Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos adicionales incluyen un resto de lisina en el extremo C terminal del polipéptido.

60 Como se ha analizado anteriormente, los aminoácidos adicionales pueden relacionarse con la producción del polipéptido de unión a albúmina. En particular, uno o más restos de aminoácidos opcionales después de la prolina C terminal pueden proporcionar ventajas cuando el polipéptido de unión a albúmina de acuerdo con el primer aspecto se produce por síntesis de péptidos químicos. Dichos restos de aminoácidos adicionales pueden evitar por ejemplo la formación de sustancias no deseadas, tales como dicetopiperazina en el estadio dipeptídico de la síntesis. Un ejemplo de dicho resto de aminoácidos es glicina. Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos adicionales

65

incluyen un resto de glicina en el extremo C terminal del polipéptido, inmediatamente después del resto de prolina o después de un resto de lisina y/o glicina adicional como se ha explicado anteriormente. Como alternativa, la producción de polipéptido puede beneficiarse de la amidación del resto de prolina C terminal de la secuencia de aminoácidos de ABD. En este caso, la prolina C terminal incluye un grupo amina adicional en el carbono carboxilo.

5 El experto en la materia es consciente de métodos para conseguir la modificación C terminal, tal como por diferentes tipos de matrices preformadas para síntesis de péptidos.

10 En otra realización, los restos de aminoácidos adicionales incluyen un resto de cisteína en el extremo N y/o C terminal del polipéptido. Dicho resto de cisteína puede preceder directamente y/o seguir a la secuencia de aminoácidos de ABD como se ha definido en el presente documento y puede proceder y/o seguir a cualquier resto de aminoácido adicional como se ha descrito anteriormente. Mediante la adición de un resto de cisteína a la cadena polipeptídica, puede obtenerse un grupo tiol para conjugación dirigida a sitio del polipéptido de unión a albúmina. Como alternativa, puede introducirse un resto de selenocisteína en el extremo C terminal de la cadena polipeptídica, de una manera similar a la introducción de un resto de cisteína, para facilitar la conjugación específica de sitio (Cheng *et al*, Nat Prot 1: 2, 2006).

20 En una realización, el polipéptido de unión a albúmina incluye no más de dos restos de cisteína. En otra realización, el polipéptido de unión a albúmina incluye no más de un resto de cisteína.

En otra realización, los restos de aminoácidos adicionales del polipéptido de unión a albúmina incluyen un "marcador" para purificación o detección del polipéptido, tal como un marcador de hexahistidilo (His₆), o un marcador "myc" ("c-Myc") o un marcador "FLAG" para la interacción con anticuerpos específicos para el marcador y/o para usarse en purificación. El experto en la materia es consciente de otras alternativas.

25 Por ejemplo, en realizaciones de polipéptidos modificados genéticamente preferidas el ABD incluye LAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 35), y sus formas de secuencia de ABD extendidas en el extremo N terminal incluyen SLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 176) y
30 GSLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 178). La serina en la posición 2 protege el extremo de la secuencia, elevando la T_m aproximadamente 2 °C en comparación con tener una glicina o una alanina en esta posición. Una alanina también puede preceder inmediatamente a la serina como en ASLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 179). También se prefieren los polipéptidos correspondientes en los que la prolina, glicina o ambos C terminales están ausentes en cada una de las
35 secuencias de ABD anteriores. En consecuencia, también se prefieren secuencias en las que el ABD incluya las formas des-prolina, que pueden mejorar los rendimientos en comparación con las formas parentales LAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL (SEC ID N°: 35), y sus formas de secuencia de ABD extendidas en el extremo N terminal incluyendo SLAEAKVLNRELD
40 KYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL (SEC ID N°: 177) y GSLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL (SEC ID N°: 180) y ASLAEAKVLNRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAL (SEC ID N°: 181). En un aspecto con cualquiera de las secuencias de ABD desveladas en el presente documento, el enlazador para exendina-4 o análogo de exendina es una glicina que incluye un enlazador como se desvela en el presente documento, por ejemplo, G, GGG, GGS, GGGG (SEC ID N°: 192), TGGGGAS (SEC ID N°: 193), TGGGGGAS (SEC ID N°: 194), o TGGGGGSAS (SEC ID N°: 195).

50 En un aspecto con cualquiera de las secuencias de ABD desveladas en el presente documento, el enlazador para el extremo C terminal de exendina-4 o análogo de exendina es un enlazador que incluye glicina como se desvela en el presente documento, por ejemplo G, GGG, GGS, GGGG, TGGGGAS, TGGGGGAS y TGGGGGSAS.

En una realización de los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento, particularmente los que terminan en su extremo C terminal con prolina u otro aminoácido que se sabe que racemiza durante la síntesis peptídica, puede añadirse una glicina al extremo C terminal para contrarrestar problemas potenciales con la racemización del resto de aminoácido C terminal. Como alternativa el aminoácido C terminal
55 puede estar en su forma amidada (grupo alfa-amino), por ejemplo prolina frente a amida de prolina, en lugar de terminar con una glicina. Sin embargo, si se desea producir el polipéptido amidado por síntesis recombinante en lugar de química, entonces puede realizarse amidación del aminoácido C terminal por varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo el uso de amidación de enzima PAM.

60 Otro aspecto de los polipéptidos modificados genéticamente es que el ABD puede proporcionar un aumento en la solubilidad en solución acuosa de una variante de exendina apenas o poco soluble. Esta propiedad puede transmitirse por el ABD en sí mismo o debido al complejo resultante del polipéptido modificado genéticamente unido a albúmina altamente soluble *in vivo* o *in vitro*, cuya asociación aumenta la solubilidad del polipéptido modificado genéticamente en solución acuosa. Por lo tanto, en una realización de ese aspecto adicional, se proporciona una
65 composición, incluyendo un compuesto de exendina que por sí mismo tiene una solubilidad en agua de no más de 1 mg/ml, o no más de 2 mg/ml o no más de 5 mg/ml, acoplado covalentemente con un dominio de unión a albúmina

como una proteína o un conjugado de fusión como se describe en el presente documento, en el que el compuesto y el polipéptido de unión a albúmina, la proteína de fusión o el conjugado se acoplan covalentemente y la solubilidad del polipéptido modificado genéticamente es mayor que la del compuesto de exendina nativa no fusionado (o no conjugado).

5 Unión a albúmina. La albúmina de suero es la proteína más abundante en sueros de mamíferos (40 g/l; aproximadamente 0,7 mM en seres humanos) donde se une con una diversidad de moléculas incluyendo pero sin limitación lípidos y bilirrubina (Peters T, 1985, *Advances in Protein Chemistry* 37: 161). Se ha observado que la semivida de la albúmina de suero es directamente proporcional al tamaño del animal, en el que por ejemplo la albúmina de suero humana (HSA) tiene una semivida de 19 días y la albúmina de suero de conejo tiene una semivida de aproximadamente 5 días (McCurdy TR *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 143: 115, 2004). La albúmina de suero humana se distribuye ampliamente por todo el cuerpo, en particular en los compartimentos intestinales y sanguíneos, en los que está implicada principalmente en el mantenimiento de la osmolaridad. Estructuralmente, las albúminas son proteínas monocatenarias que incluyen tres dominios homólogos y suman un total de 584 o 585 aminoácidos (Dugaiczky L *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 71). Las albúminas contienen 17 enlaces disulfuro y un único tiol reactivo, C34, pero carecen de restos de carbohidratos ligados a N y ligados a O (Peters, 1985, misma referencia; Nicholson JP *et al.*, 2000, *Br J Anaesth* 85: 599). La falta de glucosilación simplifica la expresión recombinante de albúmina. Esta propiedad de la albúmina, junto con el hecho de que su estructura tridimensional es conocida (He, XM y Carter, DC, *Nature* 358: 209 1992), la ha hecho una candidata atractiva para su uso en proteínas de fusión recombinantes. Dichas proteínas de fusión generalmente combinan una proteína terapéutica (que se eliminaría rápidamente del cuerpo tras la administración de la proteína en sí misma) y una proteína del plasma (que muestra una eliminación natural lenta) en una única cadena polipeptídica (Sheffield WP, *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 1: 1 2001). Dichas proteínas de fusión pueden proporcionar beneficios clínicos al requerir inyección menos frecuente y mayores niveles de proteína terapéutica *in vivo*. Sin embargo, los polipéptidos modificados genéticamente del presente documento no se conjugan con albúmina, sino que en su lugar contienen motivos que permiten la unión no covalente con albúmina.

30 Semivida de albúmina. Se ha observado que la semivida de albúmina en diferentes especies generalmente se adhiere a cambio de escala alométrica basándose en el peso del animal. Por ejemplo, la semivida de albúmina en ratón, rata, conejo y ser humano se ha estimado como 1, 1,9, 5,6 y 19 días, respectivamente. De hecho, el análisis de ajuste de potencia (Davies y Morris, 1993, *Pharm. Res. (N. Y.)* 10: 1093-1095) proporciona la ecuación:

$$\text{Semivida de albúmina (días)} = 3,75 * \text{peso corporal (kg)}^{0,368}.$$

35 Realizaciones adicionales. Se entiende que también se contempla que cada uno de los polipéptidos desvelados en el presente documento incluyen una metionina en el extremo N terminal en fase con el primer aminoácido de origen natural del mismo, por ejemplo, Met-exendina 4, que es exendina-4 con una metionina N terminal añadida. Se entiende además que cuando aparece una Gly C terminal en una secuencia polipeptídica modificada genéticamente expuesta en el presente documento, el resto puede perderse durante la amidación posterior. Algunas realizaciones son intermedios en síntesis, por ejemplo, tales como los que tienen un "marcador de His" que se usa para purificación de afinidad como se conoce en la técnica, y que opcionalmente puede retirarse posteriormente para producir un polipéptido modificado genéticamente maduro adecuado para su uso terapéutico.

45 En algunas realizaciones de cualquiera de los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento, un análogo de exendina puede tener al menos 70 %, por ejemplo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o incluso mayor, identidad de secuencia en relación con una secuencia de exendina parental. En algunas realizaciones, la exendina parental es exendina-4, y el análogo de exendina puede tener al menos 70 %, por ejemplo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o incluso mayor, identidad de secuencia en relación con exendina-4. Como se conoce en la técnica, GLP-1 (péptido de tipo glucagón 1) no es una exendina; y la secuencia de GLP-1 se excluye específicamente de secuencias de exendina adecuadas para los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento.

55 En algunas realizaciones, se proporcionan compuestos que tienen un enlazador, por ejemplo L1, como se describe en el presente documento, que se une covalentemente con un dominio de hormona polipeptídica con un péptido de ABD. En algunas realizaciones, un primer enlazador (L1) se une covalentemente con HD1 dentro del polipéptido modificado genéticamente. En algunas realizaciones, L1 es un enlace. En algunas realizaciones, el dominio de hormona polipeptídica (por ejemplo, HD1 como se describe en el presente documento) puede unirse covalentemente con el péptido de ABD mediante un enlazador peptídico. Cualquiera enlazador es opcional; es decir, cualquier enlazador puede ser simplemente un enlace. Cuando está presente la estructura química de un enlazador no es crítica porque cumple principalmente una función espaciadora. En una realización el enlazador incluye de 1 a 30 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos pueden seleccionarse de los 20 aminoácidos de origen natural (es decir, fisiológicos). Como alternativa, pueden incorporarse aminoácidos no naturales bien por síntesis química, por modificación química postraduccional o bien mediante incorporación *in vivo* por expresión recombinante en una célula hospedadora. Algunos de esos aminoácidos pueden estar glucosilados. En otra realización los 1 a 30 aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina, y además de aspartato y glutamato. En una realización adicional el enlazador está compuesto de una mayoría de aminoácidos sin

impedimento estérico, tales como glicina, alanina y/o serina. "Sin impedimento estérico" se refiere, en el sentido habitual, a un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña, por ejemplo, de 0-2 átomos no de hidrógeno, de modo que el impedimento estérico se minimiza en relación con aminoácidos que tienen cadenas laterales mayores, por ejemplo, Leu, Trp, Tyr, Phe, y similares. Las poliglicinas son particularmente útiles, por ejemplo (Gly)₃, (Gly)₄ (SEC ID N°: 125), (Gly)₅ (SEC ID N°: 126), así como polialaninas, poli(Gly-Ala) y poli(Gly-Ser). Las poliglicinas con carga pueden ser útiles e incluyen, por ejemplo, motivos poli(Gly_n-Glu) (SEC ID N°: 127), poli(Gly_n-Lys) (SEC ID N°: 128), poli(Gly_n-Asp) (SEC ID N°: 129) y poli(Gly_n-Arg) (SEC ID N°: 130) (en los que n puede ser de 1 a 6). Otros ejemplos específicos de enlazadores son (Gly)₃Lys(Gly)₄ (SEC ID N°: 131); (Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (SEC ID N°: 132); (Gly)₃Cys(Gly)₄ (SEC ID N°: 133); y GlyProAsnGlyGly (SEC ID N°: 134). Las combinaciones de Gly y Ala son particularmente útiles así como la combinación de Gly y Ser. Por lo tanto, en una realización adicional el enlazador peptídico se selecciona del grupo de un péptido rico en glicina, por ejemplo, Gly-Gly-Gly; las secuencias [Gly-Ser]_n (SEC ID N°: 135), [Gly-Gly-Ser]_n (SEC ID N°: 136), [Gly-Gly-Gly-Ser]_n (SEC ID N°: 137) y [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n (SEC ID N°: 138), en las que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, por ejemplo [Gly-Gly-Gly-Gly Ser]₃. "Péptido rico en glicina" se refiere a un polipéptido que incluye una pluralidad de restos de glicina, preferentemente una mayoría de restos de glicina, más preferentemente una preponderancia de restos de glicina.

En ciertas realizaciones, pueden usarse enlazadores con carga. Dichos enlazadores con carga pueden contener un número significativo de restos ácidos (por ejemplo, Asp, Glu y similares), o puede contener un número significativo de restos básicos (por ejemplo, Lys, Arg, y similares), de modo que el enlazador tiene un pI menor de 7 o mayor de 7, respectivamente. Como se entiende por el experto, y en igualdad de condiciones, cuanto mayor sea la cantidad relativa de restos ácidos o básicos en un enlazador dado, menor o mayor, respectivamente será el pI de ese enlazador. Dichos enlazadores pueden transmitir propiedades ventajosas a los polipéptidos modificados genéticamente desvelados en el presente documento, tales como modificar el pI (punto isoeléctrico) de los péptidos lo que a su vez puede mejorar las características de solubilidad y/o estabilidad de dichos polipéptidos a un pH particular, tal como a pH fisiológico (por ejemplo, entre pH 7,2 y pH 7,6, inclusive), o en una composición farmacéutica que incluye dichos polipéptidos. Como se conoce en la técnica, la solubilidad para un péptido puede mejorarse mediante formulación en una composición que tenga un pH que sea al menos o más de más o menos una unidad de pH del pI del péptido.

Por ejemplo, un "enlazador ácido" es un enlazador que tiene un pI de menos de 7; entre 6 y 7, inclusive; entre 5 y 6, inclusive; entre 4 y 5, inclusive; entre 3 y 4, inclusive; entre 2 y 3, inclusive; o entre 1 y 2, inclusive. De forma similar, un "enlazador básico" es un enlazador que tiene un pI de más de 7; entre 7 y 8 inclusive; entre 8 y 9, inclusive; entre 9 y 10, inclusive; entre 10 y 11, inclusive; entre 11 y 12, inclusive o entre 12 y 13, inclusive. En ciertas realizaciones, un enlazador ácido contendrá una secuencia que se selecciona del grupo de [Gly-Glu]_n (SEC ID N°: 139); [Gly-Gly-Glu]_n (SEC ID N°: 140); [Gly-Gly-Gly-Glu]_n (SEC ID N°: 141); [Gly-Gly-Gly-Gly-Glu]_n (SEC ID N°: 142), [Gly-Asp]_n (SEC ID N°: 143); [Gly-Gly-Asp]_n (SEC ID N°: 144); [Gly-Gly-Gly-Asp]_n (SEC ID N°: 145); [Gly-Gly-Gly-Gly-Asp]_n (SEC ID N°: 146), en las que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más; por ejemplo, [Gly-Gly-Glu]₆. En ciertas realizaciones, un enlazador básico contendrá una secuencia que se selecciona del grupo de [Gly-Lys]_n (SEC ID N°: 147); [Gly-Gly-Lys]_n (SEC ID N°: 148); [Gly-Gly-Gly-Lys]_n (SEC ID N°: 149); [Gly-Gly-Gly-Gly-Lys]_n (SEC ID N°: 150), [Gly-Arg]_n (SEC ID N°: 151); [Gly-Gly-Arg]_n (SEC ID N°: 152); [Gly-Gly-Gly-Arg]_n (SEC ID N°: 153); [Gly-Gly-Gly-Gly-Arg]_n (SEC ID N°: 154) en las que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, por ejemplo [Gly-Gly-Lys]₆.

Adicionalmente, pueden prepararse enlazadores que poseen ciertos motivos o características estructurales, tales como una hélice alfa. Por ejemplo, dicho enlazador puede contener una secuencia que se selecciona del grupo de [Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]_n (SEC ID N°: 155), en la que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más; por ejemplo, [Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]₃, [Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]₄ o [Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]₅. Un experto en la materia puede determinar fácilmente el contenido de hélice de cualquier secuencia enlazadora particular.

Puede usarse un enlazador biocompatible distinto desde un enlazador peptídico para unir covalentemente el extremo C terminal de una exendina con el extremo N terminal de la secuencia de ABD o ABM. El enlazador puede ser un polímero biocompatible, preferentemente soluble en agua, y más preferentemente de aproximadamente 50 kD a aproximadamente 5000 kD, o de aproximadamente 50 kD a 500 kD, o de aproximadamente 100 kD a 500 kD. Un enlazador polimérico soluble en agua biocompatible ejemplar es un enlazador de PEG, tal como -(CH₂-CH₂-O)_n, en el que n es tal que el enlazador de PEG puede tener un peso molecular de 100 a 5000 kD, preferentemente de 100 a 500 kD. Dicho enlazador puede ser -NH-CH₂-CH₂-(O-CH₂-CH₂)_n-O-CH₂-CO-, en el que n es tal que el peso molecular del enlazador de PEG es de 100 kD a 5000 kD, preferentemente de 10 kD a 500 kD. Pueden usarse otros polímeros biocompatibles, tales como incluyendo pero sin limitación polisacáridos, polipropilenglicol y copolímeros de propileno y etilenglicoles. Típicamente dicho enlazador incluirá un grupo reactivo en cada extremo que puede ser el mismo grupo reactivo o uno diferente. Dichos enlazadores con grupos reactivos se conocen y están disponibles. Preferentemente el grupo reactivo es reactivo con un grupo amino N terminal o carboxilo C terminal de un péptido. Por ejemplo, un grupo reactivo puede ser un butilaldehído, un propionaldehído, un aldehído, una succinimida o un resto de maleimida, como se conoce en la técnica. Se prefieren menos enlazadores de alquilo tales como -NH-(CH₂)_n-C(O)-, en los que n = 2-20, y que pueden sustituirse además por cualquier grupo que no ofrezca impedimento estérico a la función peptídica, tal como alquilo inferior (por ejemplo, C₁-C₆), acilo inferior, halógeno, CN y NH₂.

65

- También debe entenderse que los enlazadores adecuados para su uso de acuerdo con la invención pueden poseer una o más de las características y los motivos descritos anteriormente y en el presente documento. Por ejemplo, un enlazador puede incluir un enlazador ácido así como un motivo estructural, tal como una hélice alfa. De forma similar, un enlazador puede incluir un enlazador básico y un motivo estructural, tal como una hélice alfa. Un enlazador puede incluir un enlazador ácido, un enlazador básico, y un motivo estructural, tal como una hélice alfa. Adicionalmente, también debe entenderse que los polipéptidos modificados genéticamente de acuerdo con la invención pueden poseer más de un enlazador, y cada uno de dichos enlazadores puede poseer una o más de las características descritas en el presente documento.
- Los enlazadores descritos en el presente documento son ejemplares, y los enlazadores dentro del alcance de la presente invención pueden ser mucho más largos y pueden incluir otros restos. En una realización, se excluyen expresamente polipéptidos modificados genéticamente en los que la secuencia de exendina se une directamente con la secuencia de ABD sin un enlazador.
- En algunas realizaciones, el polipéptido modificado genéticamente incluye una secuencia de ABD en el extremo C terminal, y una secuencia de HD1 en el extremo N terminal. En ciertas realizaciones preferidas, el extremo N terminal es una secuencia de exendina, una secuencia del fragmento de exendina o una secuencia de análogo de exendina. Además de realizaciones que incluyen un ABD y un HD1, el polipéptido modificado genéticamente puede tener la estructura HD1-ABD.
- Se entiende que a falta de una indicación expresa del extremo N terminal y/o C terminal de un polipéptido modificado genéticamente expuesto en el presente documento, el polipéptido modificado genéticamente debe leerse en la orientación N terminal a C terminal. Por ejemplo, cuando HD1 tenga la secuencia de un compuesto de exendina o análogo del mismo, los términos HD1-ABD, HD1-L1-ABD, HD1-ABD, y similares significan, en ausencia de una indicación expresa del extremo N terminal y/o el C terminal, que la secuencia de exendina o análogo de la misma reside en el extremo N terminal del polipéptido modificado genéticamente, y el ABD reside en el extremo C terminal. Por el contrario, si el extremo N terminal y/o el C terminal se indican de forma expresa, entonces el polipéptido modificado genéticamente debe leerse de acuerdo con la indicación expresa de los extremos terminales. Por ejemplo, los términos HD1_{C-term}-ABD, HD1-L1-ABD_{N-term} y similares significan que el ABD reside en el extremo N terminal del polipéptido modificado genéticamente, y HD1 reside en el extremo C terminal.
- En algunas realizaciones, el polipéptido modificado genéticamente descrito en el presente documento tiene una afinidad por la albúmina de suero que es diferente de la afinidad del polipéptido de ABD solo, es decir, en ausencia de un dominio de hormona fusionado. Para obtener asociación eficaz, el polipéptido modificado genéticamente puede tener una afinidad de unión por albúmina de suero de modo que la constante de disociación K_D es, por ejemplo, menor de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M, 10^{-14} M o incluso 10^{-15} M. En algunas realizaciones, la afinidad no es excesivamente estrecha de modo que el polipéptido modificado genéticamente puede disociarse de la albúmina e inducir una respuesta biológica, por ejemplo unión con un receptor, por ejemplo, un receptor de exendina. La afinidad puede medirse como se describe en la Solicitud Publicada de PCT n.º WO 2009/016043, preferentemente para albúmina de suero humano, incluyendo sin limitación ensayos y métodos de síntesis.
- En algunas realizaciones, un polipéptido modificado genéticamente descrito en el presente documento es superior a un compuesto correspondiente que tiene un resto diferente que puede extender la semivida en plasma (por ejemplo, PEG o de Fc o albúmina) conjugado con un dominio o dominios de hormonas. En este contexto, el término "superior" se refiere a una diversidad de propiedades funcionales que podrían ponderarse en la evaluación de un tratamiento para una enfermedad o un trastorno. Por ejemplo, el polipéptido modificado genéticamente descrito en el presente documento podría requerir menos componente biológicamente activo (dominio de hormona), por ejemplo 1X, 2X, 3X, 4X, 5X, o incluso menos, que el compuesto correspondiente que tiene un resto diferente conjugado con el dominio o los dominios de hormona. Como un ejemplo adicional, el polipéptido modificado genéticamente descrito en el presente documento podría tener mayor potencia, por ejemplo, 1,5X, 2X, 3X, 4X, 5X, 10X, 20X, 50X, o incluso mayor potencia.
- Los compuestos polipeptídicos modificados genéticamente contemplados en el presente documento incluyen los compuestos expuestos en la Tabla 2 a continuación. Un compuesto preferido es el Compuesto 31.

Tabla 2. Polipéptidos modificados genéticamente_ejemplares seleccionados

| Compuesto | Secuencia |
|-----------|--|
| 5 | HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKV LANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 40) |
| 6 | HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLA NRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 41) |
| 7 | HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLA NRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 42) |
| 8 | HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLA NRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 43) |
| 10 | HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLANRELDKY GVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 51) |
| 15 | HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLA NRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 163) |
| 21 | HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLANR ELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 99) |
| 23 | HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLANR LDANGVSDFYKDKIDDAKTVEGVVVALKDLILNSLP (SEC ID N°: 169) |
| 24 | HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLANR LKKYGIGDYIKLNNNGKTAEGVTALKDEILASLP (SEC ID N°: 170) |
| 31 | HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLANRE LDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 95) |
| 32 | HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFY KRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 97) |
| 33 | HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFY KRLINKAKTVEGVEALKHLHILAAALP (SEC ID N°: 96) |

| Compuesto | Secuencia |
|-----------|---|
| 34 | <p>HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASLAEAK VLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAAP (SEC ID N°: 55);</p> |

Los compuestos polipeptídicos adicionales contemplados en el presente documento incluyen los compuestos expuestos en la Tabla 3A a continuación:

Tabla 3A. Polipéptidos modificados genéticamente ejemplares seleccionados

| Compuesto | Secuencia |
|-----------|---|
| 9 | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNNTGGGGGGGGGGGSASLAE AKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 53) |
| 11 | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNNTGGGGGGGGGGGSASLAE AKVLANRELDKYGVSDDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 62) |
| 12 | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNNTGGGGGSASLAEAKVLANRELDKY GVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 67) |
| 19 | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGSASYGVSD FYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 166) |
| 20 | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGYGVSDFYKRLIN KAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 167) |

Se contemplan específicamente compuestos de las secuencias anteriores en los que está ausente cualquier metionina N terminal. La metionina N terminal puede estar presente principalmente como una conveniencia para expresión bacteriana. Sin embargo, los péptidos modificados genéticamente de la presente invención pueden expresarse en una célula hospedadora eucariota (por ejemplo levadura (por ejemplo *Pichia*), mamífero, baculovirus) u otra célula hospedadora que tiene procesamiento proteolítico N terminal postraducciona para producir un aminoácido N terminal como se encuentra en un homólogo peptídico maduro de origen natural de la secuencia de hormona o ABD deseada, es decir sin la metionina añadida u otra secuencia líder. Como alternativa, una secuencia N terminal usada para expresión y/o secreción (e incluso purificación) puede ser una que pueda retirarse postraducciona, por ejemplo mediante el uso de una proteasa tal como TEV.

Los compuestos polipeptídicos modificados genéticamente adicionales contemplados en el presente documento, que tienen una diversidad de componentes HD1, L1 y ABD, incluyen los compuestos que tienen la estructura de cualquiera de los polipéptidos modificados genéticamente de las tablas y los listados del presente documento, incluyendo los desvelados en la Tabla 3B a continuación.

Tabla 3B. Polipéptidos modificados genéticamente ejemplares seleccionados

| Secuencia |
|--|
| HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNTGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFY KRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 51) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEA VRLFIEWLKNTGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFY KRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 52) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 53) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEA VRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 54) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNTGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFY KRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 51) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEA VRLFIEWLKNTGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFY KRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 52) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 53) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEA VRLFIEWLKNTGGGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 54) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 55) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 56) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 57) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSGGGSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 58) |

| Secuencia |
|--|
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 59) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKTGGGGSAGGGSSGGGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 60) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 61) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSAGGGSSGGGSSGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 62) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 63) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSAGGGSSGGGSSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 64) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 65) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSAGGGSSGGGSSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 66) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 67) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 68) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNTGGGGSAGGGSSGGGSSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 70) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 71) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGSAGGGSSGGGSSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 72) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 73) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISTGGGGSAGGGSSGGGSSGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 74) |

| Secuencia |
|---|
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGGSASLAEAK VLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 75) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKKTGGGGSAGGGSSGG SGGGSAS LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 76) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGGGLAEAKVLANRELDKYG VSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 77) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGGGLAEAKVLANRELDKYG VSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 78) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRELDKYGVS DFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 79) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIN KAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 80) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIN KAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 81) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGGGLAEAKVLANRELDKY GVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 82) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRELDKYGVS DFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 83) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGGLAEAKVLANR ELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 84) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGGGLAEAKVLANRELDKYG VSDFYKRLINKAKTVEGVEAKKHHILAALP (SEC ID Nº: 85) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIIN RAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 86) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSGGGLAEAKVLANRELDKYG VSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 87) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRELDKYGVS DYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 88) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINR AKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 89) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGGLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINR AKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 90) |

| Secuencia |
|---|
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGLAEAKVLANRELDKY GVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 91) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGLAEAKVLANRELDKYGVS DYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 92) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGGLAEAKVLANR ELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 93) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLANRELDKYG VSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 94) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLANRELDKYG VSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 95) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVSD FYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 96) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLIN KAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 97) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINK AKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 98) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLANRELDKYG VSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 99) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVS DFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 100) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGSLAEAKVLANR ELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID Nº: 101) |
| HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIIN RAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 102) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLANRELDKYG VSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 103) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVSD YYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 104) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINR AKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 105) |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNIINR AKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID Nº: 106) |

| Secuencia |
|--|
| HGEGTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGSLAEAKVLANRELDKYG VSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID N°: 107) |
| HGEGTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGSLAEAKVLANRELDKYGVS DYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID N°: 108) |
| HGEGTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKGGSLAEAKVLANR ELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRALKLHILAALP (SEC ID N°: 109) |

III. Método de diseño y producción

5 Diseño de construcciones. Los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento pueden diseñarse al nivel de aminoácidos. Estas secuencias pueden después retrotraducirse usando una diversidad de productos de software conocidos en la técnica de modo que la secuencia de nucleótidos se optimice para el hospedador de expresión deseado, por ejemplo expresión proteica basada, optimización de codones, contenido del sitio de restricción. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos puede optimizarse para expresión proteica basada en *E. coli* y para contenido de sitio de restricción. Basándose en la secuencia de nucleótidos de interés, pueden proporcionarse oligonucleótidos solapantes para PCR multietapas, como se conoce en la técnica. Estos oligonucleótidos pueden usarse en múltiples reacciones de PCR en condiciones bien conocidas en la técnica para construir el ADNc que codifica la proteína de interés. Para un ejemplo es Tampón Amplitaq 1X, MgCl₂ 1,3 mM, dNTP 200 μM, Amplitaq Gold 4 U, 0,2 μM de cada cebador (Amplitaq Gold, ABI), con parámetros de ciclación: (94C:30s, 58C:1 min, 72C:1 min), 35 ciclos.

15 Pueden añadirse sitios de restricción a los extremos de los productos de PCR para su uso en el ligamiento de vectores como se conoce en la técnica. Los sitios específicos pueden incluir Nde1 y Xho1, de modo que el ADNc puede estar después en la fase de lectura apropiada en un vector de expresión pET45b (Novagen). Usando estos sitios, puede retirarse cualquier Marcador His N terminal que esté en este vector ya que el sitio de inicio de la traducción estaría después cadena abajo del marcador. Una vez que se han completado las construcciones de expresión, puede realizarse verificación por secuenciación usado, por ejemplo, cebador de promotor T7, cebador de terminador T7 y protocolos ABI BigDye Term v 3.1 convencionales como se conocen en la técnica. Puede obtenerse información de secuencia de, por ejemplo, un Analizador de ADN ABI 3730 y puede analizarse usando software Vector NTI v.10 (Invitrogen). Pueden diseñarse construcciones de expresión de una manera modular de modo que puedan cortarse fácilmente secuencias enlazadoras y cambiarse, como se conoce en la técnica.

20 Pueden incorporarse sitios de reconocimiento de proteasas, conocidos en la técnica o descritos en el presente documento, en construcciones útiles para el diseño, la construcción, la manipulación y la producción de polipéptidos modificados de forma recombinante descritos en el presente documento.

30 Construcciones ejemplares. Las construcciones útiles en la producción de polipéptidos modificados genéticamente contemplados en el presente documento incluyen construcciones que codifican los polipéptidos expuestos en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Construcciones ejemplares seleccionadas para la producción de polipéptidos modificados genéticamente

| Compuesto | Secuencia |
|-----------|---|
| P1 | MAHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNTG GGSGGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEG VEALKHLILAALP (SEC ID N°: 156) |
| P2 | MAHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNTG GGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLILAAL P (SEC ID N°: 157) |
| P3 | MAHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNTG GGSGGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDDYKNIINRAKTVEG VRALKHLILAALP (SEC ID N°: 158) |
| P4 | MAHHHHHVGTGSNENLYFQHGEFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNTG GGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDDYKNIINRAKTVEGVRALKHLILAALP (SEC ID N°: 159) |
| P5 | MSDKIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCPCCKMIAPILDEIADEYQG KLTIVAKLNIQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFL DANLAGSGGHMHHHSSGLVPRGSGMKETAATAKFERQHMDSPDLGTE NLYFQHGEFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSTGGGGGG GSGGGGGSSASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKL HILAALP (SEC ID N°: 160) |
| P6 | MSDKIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCPCCKMIAPILDEIADEYQG KLTIVAKLNIQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFL DANLAGSGGHMHHHSSGLVPRGSGMKETAATAKFERQHMDSPDLGTE NLYFQHGEFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNTGGGGGGGGGGGGGG ASLAEAKVLANRELDKYGVSDDYKNIINRAKTVEGVRALKHLILAALP (SEC ID N°: 161) |

| Compuesto | Secuencia |
|-----------|---|
| P7 | MSDKIHLLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCPCCKMIAPILDEIADEYQG KLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPITLLLFKNGEVAATKVGALSQGQKEFL DANLAGSGSGMHMHHSSGLVPRGSGMKETAATAKFERQHMDSPDLGTE NLYFQHGEFTTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNNTGGGSASLAEAKVLANR ELDKYGVSDYYKNIINRAKTVEGVRAKLLHILALP (SEC ID N°: 162) |

Métodos generales de producción. Los compuestos polipeptídicos modificados genéticamente descritos en el presente documento pueden prepararse usando técnicas biológicas, químicas y/o de ADN recombinante que se conocen en este campo. Se describen métodos ejemplares en el presente documento y en la Patente de Estados Unidos n.º 6.872.700; documentos WO 2007/139941; WO 2007/140284; WO 2008/082274; WO 2009/011544; y Publicación de Estados Unidos n.º 2007/0238669. Otros métodos para preparar los compuestos se exponen en el presente documento.

Los compuestos de polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento pueden prepararse usando técnicas de síntesis peptídica de fase sólida convencionales, tales como un sintetizador de péptidos automático o semiautomático. Brevemente y en general, el péptido de ABD y hormonal terapéutico puede prepararse por separado y después conjugarse entre sí o pueden prepararse como un único polipéptido. Por lo tanto, el polipéptido de unión a albúmina, hormona terapéutica o polipéptido modificado genéticamente pueden como alternativa producirse por síntesis peptídica no biológica usando aminoácidos y/o derivados de aminoácidos que tengan cadenas laterales reactivas protegidas, incluyendo la síntesis peptídica no biológica acoplamiento por etapas de los aminoácidos y/o los derivados de aminoácidos para formar un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto que tiene cadenas laterales reactivas protegidas, retirando los grupos protectores de las cadenas laterales reactivas del polipéptido, y plegando el polipéptido en solución acuosa. Por lo tanto, se usan aminoácidos normales (por ejemplo glicina, alanina, fenilalanina, leucina y valina) y derivados de aminoácidos preprotegidos para construir secuencialmente una secuencia polipeptídica, en solución o en un soporte sólido en un disolvente orgánico. Cuando se construye una secuencia polipeptídica completa, los grupos protectores se retiran y se permite que el polipéptido se pliegue en una solución acuosa.

Cada polipéptido de acuerdo con la presente divulgación se pliega de forma reversible, plegándose el dominio ABD de forma reversible en un dominio de haz de tres hélices sin factores añadidos, y por lo tanto se pliega de forma espontánea. El conjunto modificado genéticamente puede producirse por un método que incluye producir un polipéptido de unión a albúmina de acuerdo con cualquier método, por ejemplo como se describe en el presente documento, tal como por síntesis peptídica no biológica, y conjugando el polipéptido de ABD producido con la hormona terapéutica definida en el presente documento, plegándose los ABD en el presente documento de forma completamente reversible. Esto se evaluó por análisis de espectros de dicroísmo circular; un espectro tomado a 20 °C y un segundo espectro después de calentar a 90 °C seguido de retorno a 20 °C. Durante este procedimiento la T_m , como se conoce en la técnica, se determinó y se descubrió que no cambiaba después del plegamiento del polipéptido desnaturalizado.

Típicamente, usando dichas técnicas, un aminoácido protegido por alfa-N-carbamoilo y un aminoácido unido a la cadena peptídica creciente en una resina se acoplan a TA en un disolvente inerte (por ejemplo, dimetilformamida, N-metilpirrolidinona, metileno cloruro y similares) en presencia de agentes de acoplamiento (por ejemplo, dicitclohexilcarbodiimida, 1-hidroxibenzotriazol y similares) en presencia de una base (por ejemplo, diisopropiletilamina, y similares). El grupo protector de alfa-N-carbamoilo se retira del péptido-resina resultante usando un reactivo (por ejemplo, ácido trifluoroacético, piperidina y similares) y la reacción de acoplamiento se repite con el siguiente aminoácido N protegido deseado para añadir a la cadena peptídica. Se conocen bien en la técnica grupos protectores N adecuados, tales como t-butiloxicarbonilo (tBoc), fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y similares. Los disolventes, derivados de aminoácidos y resina de 4-metilbenzidril-amina usados en el sintetizador peptídico pueden obtenerse de Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA).

Para síntesis química puede usarse síntesis peptídica de fase sólida para los polipéptidos modificados genéticamente, ya que en general la síntesis de fase sólida es un enfoque sencillo con excelente capacidad de cambio de escala a escala comercial, y es en general compatible con polipéptidos modificados genéticamente relativamente largos. La síntesis peptídica de fase sólida puede llevarse a cabo con un sintetizador peptídico automático (Modelo 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) usando el sistema NMP/HOBt (Opción 1) y la química de tBoc o Fmoc (véase APPLIED BIOSYSTEMS USER'S MANUAL FOR THE ABI 430A PEPTIDE SYNTHESIZER, Versión 1.3B 1 jul., 1988, sección 6, pp. 49-70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) con protección terminal. Pueden escindirse resinas de Boc-péptido con HF (-5 °C a 0 °C, 1 hora). El péptido puede extraerse de la resina alternando agua y ácido acético, y los filtrados pueden liofilizarse. Las resinas de Fmoc-péptido pueden escindirse de acuerdo con métodos convencionales (por ejemplo, Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc., 1990, pp. 6-12). También pueden ensamblarse péptidos usando un sintetizador Advanced Chem Tech (Modelo MPS 350, Louisville, Ky.).

Los compuestos (exendinas, ABD, enlazadores, polipéptidos modificados genéticamente) descritos en el presente documento también pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante usando métodos conocidos en este campo, tales como Sambrook *et al.*, 1989, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor. Pueden prepararse compuestos no peptídicos mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse aminoácidos que contienen fosfato y péptidos que contienen dichos aminoácidos, usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Bartlett *et al.*, 1986, Biorg. Chem., 14: 356-377. Los compuestos pueden conjugarse usando métodos de la técnica o como se describe en el presente documento.

Los polipéptidos modificados genéticamente pueden como alternativa producirse por técnicas recombinantes bien conocidas en este campo. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989 (misma referencia). Estos polipéptidos modificados genéticamente producidos por tecnologías recombinantes pueden expresarse a partir de un polinucleótido. Un experto en la materia apreciará que los polinucleótidos, incluyendo ADN y ARN, que codifican dichos polipéptidos modificados genéticamente pueden obtenerse del ADNc de tipo silvestre, por ejemplo exendina-4, teniendo en cuenta la degradación del uso codónico, y pueden modificarse genéticamente además según se desee para incorporar las sustituciones indicadas. Estas secuencias polinucleotídicas pueden incorporar codones que facilitan la transcripción y traducción de ARNm en hospedadores microbianos. Dichas secuencias de fabricación pueden construirse fácilmente de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, documento WO 83/04053. Los polinucleótidos anteriores también codifican opcionalmente un resto de metionilo N terminal. Pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica compuestos no peptídicos útiles en la presente invención. Por ejemplo, pueden prepararse aminoácidos que contienen fosfato y péptidos que contienen dichos aminoácidos usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bartlett y Landen, 1986, *Bioorg. Chem.* 14: 356-77.

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de vector de expresión/hospedador para contener y expresar una secuencia codificante de polipéptido modificado genéticamente. Estos incluyen pero sin limitación microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plasmídicos o cosmídicos; levadura transformada con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transfectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformarse con vectores de expresión bacteriana (por ejemplo, plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células animales. Las células de mamífero que son útiles en producciones de proteínas recombinantes incluyen pero sin limitación células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células WI 38, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Se conocen en la técnica y/o se describen en el presente documento protocolos ejemplares para la expresión recombinante de la proteína.

Como tales, las secuencias polinucleotídicas son útiles en la generación de nuevos vectores de ADN virales y plasmídicos útiles, nuevas células hospedadoras procariotas y eucariotas transformadas y transfectadas útiles (incluyendo células bacterianas, de levadura y de mamífero que han crecido en cultivo), y nuevos métodos útiles para crecimiento cultivado de dichas células hospedadoras con capacidad de expresión de los presentes polipéptidos modificados genéticamente. Las secuencias polinucleotídicas que codifican polipéptidos modificados genéticamente en el presente documento pueden ser útiles para terapia génica en casos en los que la infraproducción de polipéptidos modificados genéticamente se aliviaría, o se satisfaría la necesidad de niveles aumentados de los mismos.

La descripción también proporciona procesos para producción de ADN recombinante de los presentes polipéptidos modificados genéticamente. Se proporciona un proceso para producir los polipéptidos modificados genéticamente de una célula hospedadora que contiene ácidos nucleicos que codifican el polipéptido modificado genéticamente que incluye: (a) cultivar la célula hospedadora que contiene polinucleótidos que codifican el polipéptido modificado genéticamente en condiciones que faciliten la expresión de la molécula de ADN; y (b) obtener los polipéptidos modificados genéticamente.

Las células hospedadoras pueden ser procariotas o eucariotas e incluyen bacterias, células de mamífero (tales como células de Ovario de Hámster Chino (CHO), células de mono, células de riñón de cría de hámster, células cancerosas u otras células), células de levadura y células de insecto.

También se conocen bien por los expertos en la materia sistemas de hospedadores de mamífero para la expresión de la proteína recombinante. Pueden seleccionarse cepas de células hospedadoras para una capacidad particular para procesar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones postraduccionales que sean útiles para proporcionar actividad proteica. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccionales, que escinde una forma "prepro" de la proteína, también puede ser importante para la inserción, el plegamiento y/o la función correcta. Diferentes células hospedadoras, tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, y similares, tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales, y pueden elegirse para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína ajena introducida.

Como alternativa, puede emplearse un sistema de levadura para generar los polipéptidos modificados genéticamente de la presente invención. La región codificante del ADN de los polipéptidos modificados genéticamente se amplifica por PCR. Se amplifica un ADN que codifica la secuencia líder pre-pro-alfa de levadura a partir de ADN genómico de levadura en una reacción de PCR usando un cebador que contiene los nucleótidos 1-20 del gen del factor de apareamiento alfa y otro cebador complementario de los nucleótidos 255-235 de este gen (Kurjan y Herskowitz, 1982, *Cell*, 30: 933-43). La secuencia codificante líder pre-pro-alfa y los fragmentos de secuencia que codifican polipéptidos modificados genéticamente se ligan en un plásmido que contiene el promotor de la alcohol deshidrogenasa de levadura (ADH2), de modo que el promotor dirige la expresión de una proteína de

fusión que consiste en el factor pre-pro-alfa fusionado con el polipéptido modificado genéticamente maduro. Como se enseña en Rose y Broach, (Rose y Broach, 1990, Meth. Enz., 185: 234-79, Goeddel ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA), el vector incluye además un terminador de la transcripción de ADH2 cadena abajo del sitio de clonación, el origen de replicación de "2 micrómetros" de levadura, el gen de leu-2d de levadura, los genes REP1 y REP2 de levadura, el gen de beta-lactamasa de *E. coli* y un origen de replicación de *E. coli*. Los genes de beta-lactamasa y leu-2d posibilitan la selección en bacterias y levaduras, respectivamente. El gen de leu-2d también facilita un aumento del número de copias del plásmido en levadura para inducir mayores niveles de expresión. Los genes de REP1 y REP2 codifican proteínas implicadas en la regulación del número de copias del plásmido.

La construcción de ADN descrita en el párrafo precedente se transforma en células de levadura usando un método conocido, por ejemplo, tratamiento con acetato de litio (Steams *et al.*, 1990, Meth. Enz. 185: 280-297). El promotor de ADH2 se induce tras el agotamiento de la glucosa en el medio de cultivo (Price *et al.*, 1987, Gene 55: 287). La secuencia de pre-pro-alfa efectúa la secreción de la proteína de fusión de las células. Conjuntamente, la proteína KEX2 de levadura escinde la secuencia pre-pro de los polipéptidos modificados genéticamente maduros (Bitter *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5330-5334).

Los polipéptidos modificados genéticamente de la invención también pueden expresarse de forma recombinante en levadura, por ejemplo en *Pichia*, usando un sistema de expresión disponible en el mercado, por ejemplo, el Sistema de Expresión de *Pichia* (Invitrogen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema también se basa en la secuencia pre-pro-alfa para dirigir la secreción, pero la transcripción del inserto está conducida por el promotor de la alcohol oxidasa (AOX1) tras la inducción por metanol. El polipéptido modificado genéticamente secretado se purifica a partir del medio de cultivo de levadura mediante, por ejemplo, los métodos usados para purificar dicho polipéptido modificado genéticamente de sobrenadantes celulares bacterianos y mamíferos.

Como alternativa, el ADN que codifica un polipéptido modificado genéticamente puede clonarse en un vector de expresión de baculovirus, por ejemplo pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Este vector que codifica un polipéptido modificado genéticamente se usa después de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PharMingen) o técnicas conocidas para infectar células de *Spodoptera frugiperda*, cultivadas por ejemplo en medio sin proteínas SF9, y para producir proteína recombinante. La proteína se purifica y se concentra a partir del medio usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo una columna de heparina-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey) y columnas de separación por tamaños moleculares secuenciales (Amicon, Beverly, Massachusetts), y se resuspenden en solución apropiada, por ejemplo PBS. Puede usarse análisis de SDS-PAGE para caracterizar la proteína, por ejemplo mostrando una única banda que confirma el tamaño del polipéptido modificado genéticamente deseado, como puede hacerlo el análisis de secuencia de aminoácidos completa, por ejemplo secuenciación de Edman en un Secuenciador Peptídico Proton 2090, o confirmación de su secuencia N terminal.

Por ejemplo, la secuencia de ADN que codifica el polipéptido modificado genéticamente maduro predicho puede clonarse en un plásmido que contiene un promotor deseado y, opcionalmente, una secuencia líder (véase, por ejemplo, Better *et al.*, 1988, Science 240: 1041-1043). La secuencia de esta construcción puede confirmarse por secuenciación automática. El plásmido se transforma después en *E. coli*, cepa MC1061, usando procedimientos convencionales que emplean incubación con CaCl₂ y tratamiento de choque térmico de la bacteria (Sambrook *et al.*, misma referencia). Las bacterias transformadas se cultivan en medio LB complementado con carbenicilina, y se induce producción de la proteína expresada por crecimiento en un medio adecuado. Si está presente, la secuencia líder afectará a la secreción del polipéptido modificado genéticamente maduro y se escindirá durante la secreción. El polipéptido modificado genéticamente recombinante secretado se purifica a partir de medio de cultivo bacteriano mediante el método descrito en el presente documento.

Como alternativa, los polipéptidos modificados genéticamente pueden expresarse en un sistema de insectos. Los sistemas de insectos para expresión de proteínas se conocen bien por los expertos en la materia. En uno de dichos sistemas, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes ajenos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. La secuencia codificante del polipéptido modificado genéticamente se clona en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y se coloca bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción exitosa de un polipéptido modificado genéticamente hará al gen de la polihedrina inactivo y producirá virus recombinante sin recubrimiento proteico. Los virus recombinantes se usan después para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que el polipéptido modificado genéticamente de la presente invención se expresa (Smith *et al.*, 1983, J. Virol. 46: 584; Engelhard *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3224-3227).

En otro ejemplo, la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos modificados genéticamente puede amplificarse por PCR y clonarse en un vector apropiado, por ejemplo, pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey). El vector pGEX se diseña para producir una proteína de fusión que incluye glutatión-S-transferasa (GST), codificada por el vector, y una proteína codificada por un fragmento de ADN insertado en el sitio de clonación del vector. Los cebadores para la PCR pueden generarse para incluir, por ejemplo, un sitio de escisión apropiado. La proteína de fusión recombinante puede después escindirse de la parte GST de la proteína de fusión. La construcción del polipéptido modificado genéticamente/pGEX-3X se transforma en células de *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA), y se aíslan transformantes individuales y se cultivan a 37 grados C en medio LB (complementado con

carbenicilina) hasta una densidad óptica a longitud de onda de 600 nm de 0,4, seguido de incubación adicional durante 4 horas en presencia de isopropilo beta-D-tiogalactopiranosido 0,5 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, Misuri). Se purifica ADN plasmídico de los transformantes individuales y se secuencian parcialmente usando un secuenciador automático para confirmar la presencia del inserto génico que codifica el polipéptido modificado genéticamente deseado en la orientación apropiada.

La proteína de fusión, cuando se espera que se produzca como un cuerpo de inclusión insoluble en las bacterias, puede purificarse como se ha descrito anteriormente o de la siguiente manera. Se recogen células por centrifugación; se lavan en NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; y se tratan con lisozima 0,1 mg/ml (Sigma Chemical Co.) durante 15 minutos a TA. El lisado se clarifica por sonicación, y los residuos celulares se sedimentan por centrifugación durante 10 minutos a 12.000 xg. El sedimento que contiene proteína de fusión se resuspende en Tris 50 mM, pH 8 y EDTA 10 mM, estratificado sobre glicerol al 50 %, y se centrifuga durante 30 minutos a 6000 xg. El sedimento se resuspende en solución salina tamponada con fosfato convencional (PBS) sin Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺. La proteína de fusión se purifica adicionalmente fraccionando el sedimento resuspendido en un gel de SDS poliacrilamida desnaturante (Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente). El gen se empapa en KCl 0,4 M para visualizar la proteína, que se escinde y se electroeluye en tampón de ejecución en gel sin SDS. Si la proteína de fusión de GST/polipéptido modificado genéticamente se produce en bacterias como una proteína soluble, puede purificarse usando el Módulo de Purificación de GST (Pharmacia Biotech).

La proteína de fusión puede someterse a digestión para escindir la GST del polipéptido modificado genéticamente maduro. La reacción de digestión (20-40 µg de proteína de fusión, 20-30 unidades de trombina humana (4000 U/mg (Sigma) en 0,5 ml de PBS) se incuba durante 16-48 horas a TA y se carga en un gel de SDS-PAGE desnaturante para fraccionar los productos de reacción. El gen se empapa en KCl 0,4 M para visualizar las bandas proteicas. La identidad de la banda proteica correspondiente al peso molecular esperado del polipéptido modificado genéticamente puede confirmarse por análisis de secuencia de aminoácidos parcial usando un secuenciador automático (Applied Biosystems Modelo 473A, Foster City, CA).

En un método particularmente ejemplar de la expresión recombinante de los polipéptidos modificados genéticamente de la presente invención, pueden cotransfectarse células 293 de mamífero con plásmidos que contienen el ADNc de los polipéptidos modificados genéticamente en el vector pCMV (promotor CMV 5', secuencia poli A HGH 3') y pSV2neo (que contiene el gen de resistencia neo) por el método de fosfato cálcico. En una realización, los vectores deberían linealizarse con Scal antes de su transfección. De forma similar, puede usarse una construcción alternativa usando un vector pCMV similar con el gen neo incorporado. Se seleccionan líneas celulares estables a partir de clones celulares individuales por dilución limitante en medio de crecimiento que contiene G418 0,5 mg/ml (antibiótico de tipo neomicina) durante 10-14 días. Las líneas celulares se exploran con respecto a expresión de polipéptidos modificados genéticamente por ELISA o transferencia de Western, y se expanden líneas celulares de alta expresión para crecimiento a gran escala.

Es preferible que las células transformadas se usen para producción de proteínas a largo plazo, de alto rendimiento, y como tal es deseable la expresión estable. Una vez que dichas células se transforman con vectores que contienen marcadores seleccionables junto con el casete de expresión deseado, puede permitirse que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse a medio selectivo. El marcador seleccionable se diseña para conferir resistencia a selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Pueden hacerse proliferar grupos resistentes de células transformadas de forma estable usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para la célula.

Pueden usarse varios sistemas de selección para recuperar las células que se han transformado para producción de proteínas recombinantes. Dichos sistemas de selección incluyen, pero sin limitación, genes de timidina quinasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa de VHS, en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, la resistencia antimetabólica puede usarse como la base de selección de dhfr, que confiere resistencia a metotrexato; gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido, G418; además, que confiere resistencia a clorsulfurón; e higo, que confiere resistencia a higromicina. Los genes adicionales seleccionables que pueden ser útiles incluyen trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina. Los marcadores que proporcionan un indicio visual para la identificación de transformantes incluyen antocianinas, beta-glucuronidasa y su sustrato, GUS, y luciferasa y su sustrato, luciferina.

Los polipéptidos modificados genéticamente de la presente invención pueden producirse usando una combinación tanto de síntesis peptídica automática como de técnicas recombinantes. Por ejemplo, uno o ambos del compuesto de exendina y el ABD, y opcionalmente un enlazador, pueden realizarse de forma sintética o recombinante y después ligarse entre sí usando métodos conocidos en la técnica, tales como "ligamiento químico nativo" y variaciones conocidas de los mismos en los que se forma un enlace amida que une los compuestos parentales. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6326468. Como alternativa, por ejemplo, un polipéptido modificado genéticamente de la presente invención puede contener una combinación de modificaciones incluyendo delección, sustitución, inserción y derivatización por PEGilación (u otro resto, por ejemplo polímero, cadena de acilo graso, amidación C terminal). Dicho polipéptido modificado genéticamente puede producirse en estadios. En el

primer estadio, puede producirse un polipéptido modificado genéticamente intermedio que contiene las modificaciones de delección, sustitución, inserción y cualquier combinación de los mismos, mediante técnicas recombinantes como se describe. A continuación después de una etapa de purificación opcional como se describe en el presente documento, el polipéptido modificado genéticamente intermedio se PEGila (o se somete a otra derivatización química, por ejemplo, acilación, amidación C terminal) mediante modificación química con un reactivo de PEGilación apropiado (por ejemplo, de NeKtar Transforming Therapeutics, San Carlos, CA) para producir el derivado polipeptídico modificado genéticamente deseado. Un experto en la materia apreciará que el procedimiento anteriormente descrito puede generalizarse para aplicarse a un polipéptido modificado genéticamente que contenga una combinación de modificaciones seleccionadas de delección, sustitución, inserción, derivación y otros medios de modificación bien conocidos en la técnica y contemplados por la presente invención.

Puede conseguirse amidación C terminal mediante el uso de un precursor extendido en el extremo C terminal con el aminoácido glicina, sintetizado por ejemplo en levadura (por ejemplo *Pichia*) como proteína de fusión de factor alfa que se secretará al medio de cultivo. Después de la purificación, la glicina C terminal del precursor polipeptídico modificado genéticamente puede convertirse en amida por amidación enzimática, por ejemplo monooxigenasa de amidación de peptidilglicina alfa (PAM). Véase por ejemplo, Cooper *et al.*, 1989, Biochem. Biophys. Acta, 1014: 247-258. Véase también Patente de Estados Unidos 6319685, que enseña métodos para la amidación enzimática, incluyendo una enzima de amidación alfa de rata que es suficientemente pura en enzima de amidación alfa para mostrar una actividad específica de al menos aproximadamente 25 mU por mg de proteína, y que está suficientemente libre de impurezas proteolíticas para ser adecuada para su uso con sustratos purificados a partir de fuentes naturales o producidos por técnicas de ADN recombinante.

Pueden purificarse péptidos por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo como se describe en el presente documento. En un método los péptidos se purifican por RP-HPLC (preparatorio y analítico) usando un sistema Waters Delta Prep 3000. Puede usarse una columna preparatoria C4, C8 o C18 (10 μ , 2,2 X 25 cm; Vydac, Hesperia, CA) para aislar péptidos, y la pureza puede determinarse usando una columna analítica C4, C8 o C18 (5 μ , 0,46 X 25 cm; Vydac). Pueden suministrarse disolventes (A=0,1 % TFA/agua y B=0,1 % TFA/CH₃CN) a la columna analítica a un caudal de 1,0 ml/minuto y a la columna preparatoria 15 ml/minuto. Pueden realizarse análisis de aminoácidos en el sistema Waters Pico Tag y procesarse usando el programa Maxima. Los péptidos pueden hidrolizarse por hidrólisis ácida de fase de vapor (115 °C, 20-24 h). Los hidrolizados pueden derivatizarse y analizarse por métodos convencionales (Cohen *et al.*, THE PICO TAG METHOD: A MANUAL OF ADVANCED TECHNIQUES FOR AMINO ACID ANALYSIS, pp. 11-52, Millipore Corporation, Milford, Mass. (1989)). Puede llevarse a cabo análisis por bombardeo de átomos rápido mediante M-Scan, Incorporated (West Chester, Pa.). Puede realizarse calibración de masas usando yoduro de cesio o yoduro de cesio/glicerol. Puede llevarse a cabo análisis de ionización y desorción en plasma usando detección de tiempo de vuelo en un espectrómetro de masas Applied Biosystems Bio-Ion 20.

Ensayo de expresión de polipéptidos modificados genéticamente. Están disponibles métodos para ensayar el nivel de expresión proteica por una célula hospedadora. Se ejemplifican procedimientos útiles para ensayar el nivel de expresión proteica por una célula hospedadora en el siguiente protocolo típico. Se transforman aproximadamente 25 μ l de células *E. coli* BL21 con 2 μ l de ADN plasmídico (vector de expresión para el polinucleótido modificado genéticamente). Las células pueden sembrarse e incubarse durante una noche a 37 °C o a temperatura ambiente (TA) durante un periodo de 48 h. Puede seleccionarse una única colonia y usarse para cultivar un cultivo de partida en 4 ml de medio LB con antibiótico apropiado durante ~6 horas. Pueden prepararse reservas de glicerol añadiendo 100 μ l de glicerol estéril al 80 % a una reserva de 900 μ l, que después pueden mezclarse suavemente y almacenarse a -80 °C. Puede retirarse una muestra de 250 μ l para muestra no inducida por TCP. Puede inocularse una alícuota, por ejemplo, de 2 ml de medio Magic que contiene antibiótico apropiado con 5 μ l de cultivo de partida, que después puede incubarse durante una noche (hasta 24 horas) a 37 °C, 300 rpm. Como se conoce en la técnica, el Medio Magic es autoinductor. Como alternativa, pueden inocularse 60 ml de Medio Magic que contiene antibiótico apropiado con 60 μ l de cultivo de partida en un matraz de Thompson de 250 ml o 125 ml, que después puede incubarse durante una noche (hasta 24 horas) a 30 °C, 300 rpm. Después de la incubación, pueden retirarse 250 μ l de cultivo de cada tubo y sedimentarse las células. La célula puede resuspenderse en 1 ml de Tris 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, a lo que pueden añadirse 0,1 volúmenes (100 μ l) de reactivo de cultivo POP y 1 μ l de r-lisozima (dilución 1:750 en tampón de r-lisozima). La mezcla puede mezclarse bien e incubarse al menos 10 minutos a TA. La preparación puede después centrifugarse 10 minutos a 14.000 x G. El sobrenadante (fracción soluble) puede retirarse y conservarse, y las muestras pueden prepararse para análisis de gel (15 μ l + 5 μ l de LDS). El sedimento de cuerpos de inclusión restante puede resuspenderse en 1 ml de SDS 1 % con sonicación. La muestra puede prepararse para análisis de gel (15 μ l + 5 μ l de LDS). Para muestras no inducidas, pueden añadirse 1,0 volúmenes de reactivo de cultivo POP y 1 μ l de r-lisozima (dilución 1:750 en tampón de r-lisozima). La mezcla puede mezclarse bien e incubarse al menos 10 minutos a TA. Puede no ser necesario centrifugar estas muestras. La muestra puede después prepararse para análisis de gel (15 μ l + 5 μ l de LDS). Pueden procesarse geles NU-PAGE (4-12 %) no reducidos en tampón 1X MES y teñirse con protocolos de microondas SimplyBlue. La decoloración puede realizarse durante una noche, como se conoce en la técnica. Puede conservarse una imagen del gel, y analizarse para determinar los niveles de expresión de proteínas.

Los polipéptidos modificados genéticamente pueden expresarse y se expresaron y se aislaron de la siguiente manera. Se diseñó una secuencia proteica del polipéptido modificado genéticamente deseado y se retrotrajo usando software comercial a una secuencia de ADN para clonarlo en un vector de expresión de *E. coli*. Se obtuvieron secuencias de ácido nucleico como oligonucleótidos y se ligaron usando técnicas de amplificación por PCR convencionales, o se digirieron a partir de construcciones de expresión existentes usando enzimas de restricción convencionales y después se ligaron entre sí. Se colocaron secuencias de expresión de la proteína de interés en el plásmido pET45 con un promotor T7 para expresión inducible. Después de verificarse las construcciones por secuenciación, el ADN del vector se purificó y se transformó en una hospedadora de expresión, típicamente BL21(DE3). Se seleccionó una única colonia para cultivar un cultivo de partida en 4 ml de medio LB durante ~6 horas. Se prepararon reservas de glicerol añadiendo 100 µl de glicerol 80 % a 900 µl de reserva y se almacenaron a -80 °C. Opcionalmente, se conservaron 500 µl de muestra no inducida para análisis de gel. Se inoculó un cultivo de 60 ml (por ejemplo Medio de Expresión de *E. coli* MagicMedia™; Invitrogen, Estados Unidos; véase Glenn *et al.*, J. Biol. Chem. 2008, 283(19): 12717-29) usando un cultivo de partida de 60 µl en un matraz Thompson de 125 ml y se incubó a 30 grados C durante una noche. Se retiraron 250 µl de muestra para su análisis. Las células se recogieron como un sedimento por centrifugación, y se congelaron para procesamiento posterior. Se realizó la preparación del extracto celular y la purificación del primer pase con resina de níquel de la siguiente manera. Se resuspendieron completamente sedimentos celulares de *E. coli* en un volumen de tampón de lisis (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) igual al volumen de cultivo de partida. Después las células se sometieron a un microfluidificador (Microfluidics, MA) a 0,69 MPa tres veces. Los extractos celulares se centrifugaron durante 30 minutos a 16.000 xg para retirar los residuos. Se añadió EGTA (reserva de 150 mM) al extracto celular hasta una concentración final de EGTA 3 mM. El lisado se aplicó después a una columna Ni-NTA Superflow que se había lavado y preequilibrado. Después se lavó la proteína unida a la columna con tampón de lisis más EGTA (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0, EGTA 3 mM) antes de eluirse la proteína unida con 50 ml de tampón de elución (TrisHCl 25 mM, NaCl 50 mM, Imidazol 250 mM, pH 8,0). La escisión del Marcador de His y posterior purificación fue la siguiente. La proteína eluida se concentró con la unidad de filtro de centrifuga Amicon-Ultra15 (Millipore, Estados Unidos) y después se diluyó con TrisHCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM para preparar la digestión con proteasa que retira el Marcador de His del extremo N terminal de la proteína deseada. Se añadieron β-mercaptoetanol 0,1 % y Turbo TEV proteasa 1 % (2 mg/ml, 10.000 unidades/mg; Excellgen, Estados Unidos) a la solución de proteína, que se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 4 horas y después a 4 °C durante una noche. Se preequilibró una columna de Ni-NTA Superflow (Qiagen, Estados Unidos) con TrisHCl 50 mM, NaCl 100 mM, imidazol 45 mM, pH 8,0. La reacción de digestión de TEV se diluyó 2 veces con TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0. La reacción de digestión diluida se aplicó cuidadosamente a la parte superior de la columna de Ni-NTA y se recogió el flujo continuo. A la columna se añadieron 10 ml de TrisHCl 50 mM, NaCl 100 mM, imidazol 45 mM, pH 8,0 para eluir cualquier proteína no unida. Las proteínas eluidas de la columna se recogieron y combinaron, y después se pulieron usando cromatografía de exclusión por tamaño (2x con columna de Superdex 75 HiLoad 26/60; GE Healthcare Biosciences, Estados Unidos). Se retiró cualquier endotoxina bacteriana restante usando EndoTrap Red (Lonza, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Preparación de cuerpos de inclusión. Para polipéptidos modificados genéticamente que se encuentran en la fracción de cuerpos de inclusión, el siguiente procedimiento puede ser beneficioso. El sedimento celular puede resuspenderse en un mínimo de 100 ml de tampón de lisis para cada 50 ml de cultivo. Tras la adición de 30 ml, puede usarse una pipeta de 10 ml para resuspender, después el tubo puede lavarse con 70 ml adicionales. La solución celular resuspendida puede procesarse de forma múltiple, por ejemplo, 4 pases, a través de un microfluidificador a 0,69 MPa (min) teniendo cuidado de mantener la cámara en agua helada durante el proceso completo. La suspensión fluidificada puede centrifugarse a 14.000 xg, 20 minutos (por ejemplo, JLA 10,5, 10.000 rpm, usando frascos de nalgene de 250 ml). El sedimento de cuerpos de inclusión puede resuspenderse en hielo en tampón de lisis helado con una barra de agitación y placa de agitación durante 1 hora a 4 °C después de romper con una punta de pipeta. El sedimento puede resuspenderse una segunda vez en H₂O destilada con una barra de agitación y placa de agitación durante 1 hora a 4 °C después de romper con una punta de pipeta, seguido de centrifugación a 14000 xg, 15 minutos. El sobrenadante puede retirarse y descartarse. El resultante puede almacenarse a -80 °C.

Purificación de proteínas. Como se describe en el presente documento, se conocen numerosos métodos para el aislamiento de polipéptidos expresados. Preferentemente se secretan polipéptidos modificados genéticamente. Sin embargo, lo siguiente es un ejemplo si se forman cuerpos de inclusión. Los sedimentos de cuerpos de inclusión pueden solubilizarse en el volumen apropiado de tampón de solubilización (urea 8 M o guanidina 8 M, Tris 50 mM, DTT 10 mM, pH 7,75) durante 1 hora a TA. Los sedimentos solubilizados pueden centrifugarse durante 20 minutos a 27000 g. El sobrenadante filtrado (por ejemplo, 0,4 µm) puede transferirse gota a gota en volumen apropiado de tampón de replegamiento (Tris-HCl 50 mM, urea 1 M, arginina 0,8 M, cisteína 4 mM, cistamina 1 mM; pH 8) a TA. El resultado puede después colocarse a 4 °C durante una noche o más con mezclado suave. Las muestras pueden concentrarse y procesarse en una columna de filtración en gel (Superdex75 26/60) a 1-2 ml/min en un ambiente a 4 °C usando un GE Healthsciences AKTA FPLC. Pueden identificarse fracciones que contienen proteínas apropiadas mediante SDS-PAGE, agruparse y procesarse a través de una segunda columna de filtración en gel. La proteína agrupada puede después concentrarse en un filtro Amicon hasta su concentración apropiada y ensayarse con respecto a niveles de endotoxina usando, por ejemplo, Endosafe PTS Reader (Charles River), como se conoce en la

técnica. Una vez que una muestra proteica ha pasado los criterios de endotoxinas, puede esterilizarse por filtración, distribuirse en alícuotas y procesarse a través de ensayos de control de calidad. Los ensayos de control de calidad pueden incluir HPLC-SEC analítico, SDS PAGE no reductor y RP HPLC - MS para obtener la masa aproximada. Pueden obtenerse proteínas en PBS 1x (cloruro sódico 137 mM, cloruro potásico 2,7 mM, fosfato disódico 4,3 mM, fosfato monopotásico 1,4 mM, pH 7,2), distribuirse en alícuotas y congelarse inmediatamente para almacenamiento a -70 a -80 °C.

IV. Métodos de uso y tratamiento de la enfermedad

Indicaciones. Se contempla una diversidad de enfermedades y trastornos para tratarse beneficiosamente por los compuestos polipeptídicos y métodos descritos en el presente documento.

Obesidad y sobrepeso. La obesidad y sus trastornos asociados incluyendo el sobrepeso son problemas de salud pública habituales y graves en los Estados Unidos y en todo el mundo. La obesidad de la parte superior del cuerpo es el factor de riesgo más fuerte conocido para diabetes mellitus de tipo 2 y es un factor de riesgo fuerte para la enfermedad cardiovascular. La obesidad es un factor de riesgo reconocido para hipertensión, aterosclerosis, insuficiencia cardiaca congestiva, ictus, enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis, apnea del sueño, trastornos reproductores tales como síndrome de ovario poliquístico, cánceres de mama, próstata y colon, e incidencia aumentada de complicaciones de anestesia general. Véase, por ejemplo, Kopelman, 2000, Nature 404: 635-43.

La obesidad reduce la esperanza de vida y conlleva un grave riesgo de comorbilidades enumeradas anteriormente, así como trastornos tales como infecciones, venas varicosas, acantosis pigmentaria, eccema, intolerancia al ejercicio, resistencia a insulina, hipertensión, hipercolesterolemia, colelitiasis, lesión ortopédica y enfermedad tromboembólica. Véase, por ejemplo, Rissanen *et al*, 1990, Br. Med. J., 301: 835-7. La obesidad también es un factor de riesgo para el grupo de afecciones denominadas síndrome de resistencia a insulina, o "Síndrome X" y síndrome metabólico. El coste médico global de la obesidad y sus trastornos asociados es enorme.

Se cree que la patogénesis de obesidad es multifactorial. Un problema es que, en sujetos obesos, la disponibilidad de nutrientes y el gasto de energía no entran en equilibrio hasta que haya un exceso de tejido adiposo. El sistema nervioso central (SNC) controla el equilibrio de energía y coordina una diversidad de actividades conductuales, autónomas y endocrinas apropiadas para el estado metabólico del animal. Los mecanismos o sistemas que controlan estas actividades se distribuyen en general a través del prosencéfalo (por ejemplo, hipotálamo), romboencéfalo (por ejemplo, tronco encefálico), y médula espinal. En última instancia, la información metabólica (es decir, disponibilidad de combustible) y cognitiva (es decir, preferencias aprendidas) de estos sistemas se integra y la decisión de iniciar conductas apetitivas (búsqueda de comida) y consumatorias (ingestión) se enciende (obtención de alimento e inicio) o se apaga (terminación de la comida). Se cree que el hipotálamo es principalmente responsable de integrar estas señales y después emitir órdenes al tronco encefálico. Los núcleos del tronco encefálico controlan los elementos del sistema de control motor consumatorio (por ejemplo, músculos responsables de masticar y tragar). Como tales, estos núcleos del SNC se han denominado literalmente constituyentes de la "ruta común final" para el comportamiento ingestivo.

Las pruebas neuroanatómicas y farmacológicas apoyan que las señales de energía y homeostasis nutricional se integran en núcleos del prosencéfalo y que el sistema de control motor consumatorio reside en núcleos del tronco encefálico, probablemente en regiones que rodean al núcleo motor trigémino. Estas son conexiones recíprocas extensivas entre el hipotálamo y el tronco encefálico. Una diversidad de productos terapéuticos antiobesidad dirigidos al SNC (por ejemplo, moléculas pequeñas y péptidos) se centran predominantemente en sustratos del prosencéfalo que residen en el hipotálamo y/o en sustratos del romboencéfalo que residen en el tronco encefálico.

La obesidad sigue siendo un trastorno metabólico poco tratable, crónico, esencialmente intratable. En consecuencia, existe la necesidad de nuevas terapias útiles en la reducción del peso y/o el mantenimiento del peso en un sujeto. Dichas terapias conducirían a un efecto beneficioso profundo en la salud del sujeto.

Diabetes y enfermedad cardiovascular. La diabetes mellitus está reconocida como una enfermedad compleja, crónica, en la que del 60 % al 70 % de toda la letalidad entre pacientes diabéticos es el resultado de complicaciones cardiovasculares. La diabetes no se considera solamente un riesgo de enfermedad cardiaca coronaria equivalente sino que también se identifica como un predictor independiente de acontecimientos adversos, incluyendo infarto de miocardio recurrente, insuficiencia cardiaca congestiva y muerte después de un incidente cardiovascular. Se esperaría que la adopción de un control más estrecho de la glucosa y tratamiento agresivo para factores de riesgo cardiovascular redujera el riesgo de complicaciones de enfermedad cardiaca coronaria y mejorara la supervivencia general entre pacientes diabéticos. Sin embargo, los pacientes diabéticos tienen de dos a tres veces más probabilidad de experimentar un infarto de miocardio agudo que pacientes no diabéticos, y los pacientes diabéticos viven de ocho a trece años menos que los pacientes no diabéticos.

Entendiendo la naturaleza de alto riesgo de pacientes diabéticos/con infarto de miocardio agudo, las directrices de práctica clínica del Colegio Americano de Cardiología/Asociación Americana del Corazón ("ACC/AHA") para el control de pacientes hospitalizados con angina inestable o infarto de miocardio sin elevación de ST (denominado de

forma colectiva "ACS") reconocieron recientemente que los pacientes diabéticos hospitalizados son una población especial que requiere control agresivo de la hiperglucemia. Específicamente, las directrices indican que la terapia reductora de glucosa para pacientes diabéticos/con ACS hospitalizados debería dirigirse a conseguir una glucosa preprandial menor de 10 mg/dl, un diana diaria máxima de 180 mg/dl, y una hemoglobina A1c postdescarga menor del 7 %.

En una muestra nacional de pacientes con ACS ancianos, se demostró que un aumento de la mortalidad a los 30 días en pacientes diabéticos correspondía a los pacientes que tenían mayores valores de glucosa tras su admisión en el hospital. Véase "Diabetic Coronary Artery Disease & Intervention", *Coronary Therapeutics* 2002, Oak Brook, IL, 20 de septiembre de 2002. Hay pruebas crecientes de que la hiperglucemia sostenida en lugar de glucosa elevada transitoria tras la admisión en el hospital está relacionada con acontecimientos adversos graves. Aunque la medida ideal para hiperglucemia y riesgo vascular en pacientes no se conoce fácilmente, parece que el valor de glucosa medio durante la hospitalización es más predictivo de mortalidad. En un estudio separado de pacientes con ACS de más de cuarenta hospitales en los Estados Unidos, se descubrió que la hiperglucemia persistente, a diferencia de los valores de glucosa aleatorios tras la admisión al hospital, era más predictiva de la mortalidad en el hospital. Véase *Acute Coronary Syndrome Summit: A State of the Art Approach*, Kansas City, MO, 21 de septiembre, 2002. En comparación con los valores de glucosa tras la admisión, un modelo de regresión logística de control de glucosa durante la hospitalización completa era más predictivo de la mortalidad. Hubo un riesgo aumentado casi dos veces de mortalidad durante la hospitalización para cada 10 mg/dl de aumento de la glucosa sobre 120 mg/dl. En una cohorte más pequeña de pacientes diabéticos/con ACS consecutivos, hubo un aumento escalonado en la mortalidad al año con niveles de glucosa crecientes tras la admisión en el hospital. En el ambiente hospitalario, las directrices de ACC/AHA sugieren el inicio de la terapia de insulina agresiva para conseguir reducir la glucosa en sangre durante la hospitalización.

Enfermedades de regulación de lípidos. La dislipidemia es una alteración en el componente de lípidos normales en la sangre. Se cree que la elevación prolongada de niveles de insulina puede conducir a dislipidemia. La hiperlipidemia es la presencia de niveles elevados o anómalos de lípidos y/o lipoproteínas en la sangre. La enfermedad del hígado graso, por ejemplo, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) se refiere a un amplio espectro de enfermedad hepática que varía de hígado graso simple (esteatosis), a esteatohepatitis no alcohólica (NASH), a cirrosis (cicatrización irreversible, avanzada, del hígado). Todos los estadios de NAFLD tienen en común la acumulación de grasa (infiltración de grasa) en las células del hígado (hepatocitos).

Adicionalmente, sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que la deficiencia de insulina relativa en diabetes de tipo 2, toxicidad de glucosa y carga de ácidos grasos libres hepáticos aumentada mediante suministro elevado de tejido adiposo intraabdominal a través de la vena porta, están implicados como posibles causas en trastornos de hígado graso. De hecho, se ha planteado la hipótesis de que el comportamiento alimenticio es el factor clave que conduce el síndrome metabólico de obesidad con sus muchos corolarios, incluyendo NASH. En consecuencia, los tratamientos dirigidos a reducir el consumo de alimentos y aumentar el número de comidas pequeñas, como ya se ha demostrado en diabetes de tipo 2, pueden tratar y evitar eficazmente NASH. Los fármacos que promueven la secreción de insulina y la pérdida de peso, y retardan el vaciado gástrico también son eficaces en la mejora de la tolerancia a la glucosa y por lo tanto pueden mejorar el hígado graso con su hiperinsulinemia consiguiente. Por lo tanto, el uso de exendinas, agonistas de análogos de exendina, agonistas de derivados de exendinas, particularmente exendina-4, puede ser adecuado como una modalidad de tratamiento para esta afección. En consecuencia, los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento que incluyen una exendina o un componente peptídico biológicamente activo (dominio hormonal), o fragmento o análogo del mismo, pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos de hígado graso.

Enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (AD), como se conoce en la técnica, se asocia con placas y ovillos en el cerebro que incluyen desregulación de la proteína A-beta. Se ha indicado que la estimulación de receptores GLP-1 neuronales desempeña un papel importante en la regulación de la plasticidad neuronal y la supervivencia celular. Se ha indicado que GLP-1 induce el crecimiento de neuritas y protege contra la muerte celular excitotóxica y lesión oxidativa en células neuronales cultivadas. Se ha indicado que GLP-1 y exendina-4 reducen los niveles endógenos de péptido beta amiloide (proteína A-beta) en el cerebro de ratón y reducen los niveles de proteína precursora beta amiloide (beta-APP) en neuronas. Véase, por ejemplo, Perry *et al.*, 2004, *Curr. Drug Targets* 5(6): 565-571. El tratamiento con los compuestos modificados genéticamente desvelados en el presente documento puede proporcionar beneficio a las dianas terapéuticas asociadas con enfermedad de Alzheimer.

Enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson (PD) es el sinónimo de "parkinsonismo primario", es decir parkinsonismo aislado debido a un proceso neurodegenerativo sin ninguna causa sistémica secundaria. El parkinsonismo se caracteriza por síntomas de temblor, rigidez y ralentización del movimiento provocado por la pérdida de dopamina. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que la exendina-4 puede actuar como un factor de supervivencia para neuronas dopaminérgicas actuando como un factor desactivador de microglía y sugiere que la exendina 4 puede ser un agente terapéutico valioso para enfermedades neurodegenerativas tales como PD.

Síndrome metabólico X. El Síndrome Metabólico X se caracteriza por resistencia a insulina, dislipidemia, hipertensión y distribución visceral de tejido adiposo, y desempeña un papel clave en la patofisiología de diabetes

de tipo 2. También se ha descubierto que está fuertemente correlacionado con NASH, fibrosis y cirrosis del hígado. En consecuencia, los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento del síndrome metabólico X.

5 Diabetes inducida por esteroides. Se conocen bien glucocorticoides que afectan al metabolismo de carbohidratos. En respuesta a la administración de glucocorticoides exógena, se observa aumento de la producción de glucosa hepática y reducción de la secreción de insulina y captación de glucosa estimulada por insulina en tejidos periféricos. Además, el tratamiento con glucocorticoides altera la relación de proinsulina (P1)/insulina inmunorreactiva (IRI),
10 como se conoce en la técnica. Las características típicas de la hiperglucemia inducida por glucocorticoides en sujetos sin diabetes incluyen una elevación mínima de la glucosa en sangre en ayunas, hiperglucemia postprandial excesiva, insensibilidad a insulina exógena y ausencia de respuesta a terapia con metformina o sulfonilurea. En consecuencia, los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento que incluyen un componente peptídico biológicamente activo (dominio hormonal) de exendina, o fragmento o análogo del mismo, pueden ser útiles en el tratamiento de diabetes inducida por esteroides.

15 Diabetes Inducida por Tratamiento con Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Poco después de la introducción de inhibidores de proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-1 (PI) en el uso clínico rutinario, comenzaron a aparecer informes que ligaban el uso de PT con el desarrollo de hiperglucemia. Aunque aproximadamente del 1 % al 6 % de sujetos infectados por VIH que se tratan con PI desarrollarán diabetes mellitus, una proporción considerablemente mayor desarrollará resistencia a insulina y tolerancia a la glucosa alterada. En consecuencia, los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento que incluyen un componente peptídico biológicamente activo (dominio hormonal) de exendina, o fragmento o análogo del mismo, pueden ser útiles en el tratamiento de diabetes inducida por tratamiento del VIH.

25 Diabetes Autoinmunitaria Latente en Adultos (LADA). Se cree que la diabetes autoinmunitaria progresiva, también conocida como diabetes autoinmunitaria latente en adultos (LADA), está presente en aproximadamente el 10 % de los pacientes a los que se ha diagnosticado diabetes de tipo 2. Los pacientes con LADA tienen anticuerpos en circulación para antígeno citoplasmático de células de islotes o, más frecuentemente, ácido glutámico descarboxilasa. Estos sujetos muestran elementos clínicos característicos de diabetes tanto de tipo 1 como de tipo
30 2. Aunque la secreción de insulina está mejor conservada en la forma de progresión lenta que la de progresión rápida de la diabetes autoinmunitaria, la secreción de insulina tiende a deteriorarse con el tiempo en sujetos con LADA. En consecuencia, los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento que incluyen un componente peptídico biológicamente activo (dominio hormonal) de exendina, o fragmento o análogo del mismo, pueden ser útiles en el tratamiento de LADA.

35 Desconocimiento de la hipoglucemia (HU). Puede producirse contrarregulación de glucosa defectuosa incluso después de solamente un único episodio reciente de hipoglucemia. Los sujetos que experimentan episodios repetidos de hipoglucemia con frecuencia pierden su capacidad de reconocer los síntomas típicamente asociados con hipoglucemia o choque de insulina inminente, una afección denominada "desconocimiento de la hipoglucemia".
40 Debido a que el paciente no aprecia su propio estado, los niveles de glucosa en sangre pueden entonces bajar tanto que surgen problemas neurológicos graves, incluyendo coma y ataques. En consecuencia, los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento que incluyen un componente peptídico biológicamente activo (dominio hormonal) de exendina, o fragmento o análogo del mismo, pueden ser útiles en el tratamiento de HU.

45 Enfermedad Pulmonar Restrictiva. Se ha localizado receptor de GLP 1 en el pulmón. Las exendinas pueden inducir una respuesta biológica a través del receptor de GLP-1. En particular, la sarcoidosis es una enfermedad granulomatosa sistémica que implica frecuentemente al pulmón. Aunque tradicionalmente se ha considerado una enfermedad pulmonar restrictiva, la obstrucción de las vías respiratorias se ha convertido en una característica reconocida de la enfermedad en los últimos años. La sarcoidosis puede afectar a las vías respiratorias a cualquier nivel y cuando la implicación incluye vías respiratorias pequeñas, puede asemejarse a enfermedades de las vías respiratorias obstructivas más comunes, tales como asma y bronquitis crónica. En consecuencia, los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento que incluyen un componente peptídico biológicamente activo (dominio hormonal) de exendina, o fragmento o análogo del mismo, pueden ser útiles en el
50 tratamiento de la enfermedad pulmonar restrictiva debido a que dicho péptido de dominio hormonal puede mejorar la elasticidad del pulmón o retardar la rigidez.

Síndrome del Intestino Corto (SBS). Se ha indicado que la exendina-4 es eficaz para el tratamiento del síndrome del intestino corto. Véase Kunkel *et al.* Neurogastroenterol. Motil. (2011). El SBS es un trastorno clínico grave caracterizado por diarrea y carencias nutricionales. El péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), producido por células L en el íleon, regula el tránsito intestinal próximo. Cuando se produce resección ileal extensiva, como en SBS, los niveles de GLP-1 pueden ser deficientes. La exenatida mejoró el estado nutricional y los síntomas intestinales de pacientes con SBS. En consecuencia, los pacientes con SBS son susceptibles de tratamiento con los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento. Puede conseguirse mejora en la frecuencia y forma intestinal y obtener movimientos intestinales que ya no están relacionados con la comida. Un beneficio adicional es que puede
65 detenerse la nutrición parenteral total. Estos compuestos del presente documento proporcionarán mejora sustancial

en los hábitos intestinales, estado nutricional y calidad de vida de los pacientes con SBS, y pueden reducir adicionalmente la necesidad de nutrición parenteral y trasplante de intestino delgado.

5 En consecuencia, la presente invención se refiere al polipéptido modificado genéticamente para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto. El sujeto necesita tratamiento para la enfermedad o el trastorno. En algunas realizaciones, el sujeto que necesita tratamiento es obeso. La enfermedad o el trastorno es diabetes, sobrepeso, obesidad, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de hígado graso, dislipidemia, enfermedad de las arterias coronarias, ictus, SBS o hiperlipidemia, u otras enfermedades analizadas en el presente documento. La diabetes puede incluir diabetes de tipo I, de tipo II, gestacional o prediabetes así como diabetes inducida por VIH o esteroides. El tratamiento incluye la administración al sujeto de un polipéptido modificado genéticamente como se describe en el presente documento en una cantidad eficaz para el tratamiento de la enfermedad o el trastorno. Son particularmente útiles para estas enfermedades compuestos descritos en el presente documento que tienen actividad reductora de glucosa (por ejemplo exendina-4 o sus fragmentos o análogos ligados a un ABD), que tienen reducción del peso corporal o reducción de la actividad de consumo de alimentos, reducción de HbA1c, retardo del vaciado gástrico, reducción del glucagón en plasma y/o mejora de la movilidad intestinal.

15 En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno es diabetes, sobrepeso u obesidad, o dislipidemia o hiperlipidemia. El polipéptido modificado genéticamente puede incluir polipéptidos de ABD y HD1, y opcionalmente un enlazador K1, en el que HD1 es una exendina o un fragmento o análogo de la misma. En consecuencia, el polipéptido modificado genéticamente puede tener una de las siguientes estructuras: HD1-ABD o HD1-L1-ABD.

20 En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno es diabetes, sobrepeso, obesidad, dislipidemia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de hígado graso, SBS o hiperlipidemia. El polipéptido modificado genéticamente puede incluir una exendina o fragmento o análogo de la misma. En consecuencia, el polipéptido modificado genéticamente puede tener una de las siguientes estructuras: HD1-ABD o HD1-L1-ABD. En algunas realizaciones, la exendina en el polipéptido modificado genéticamente es exendina-4. En algunas realizaciones, el fragmento de exendina es un fragmento de exendina-4. En algunas realizaciones, el análogo de exendina tiene al menos 70 %, por ejemplo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o incluso mayor identidad con exendina-4. Son particularmente útiles para estas enfermedades compuestos descritos en el presente documento que tienen actividad reductora de glucosa (por ejemplo exendina-4 o sus fragmentos o análogos ligados a un ABD), que tienen reducción del peso corporal o reducción de la actividad de consumo de alimentos, reducción de HbA1c, retardo del vaciado gástrico, reducción del glucagón en plasma o mejora de la movilidad intestinal.

25 En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno es diabetes, sobrepeso, obesidad, dislipidemia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de hígado graso, SBS o hiperlipidemia. El polipéptido modificado genéticamente puede incluir una exendina o un fragmento o análogo de la misma. En consecuencia, el polipéptido modificado genéticamente puede tener una de las siguientes estructuras: HD1 ABD o HD1 L1 ABD. En algunas realizaciones, la exendina es exendina-4. En algunas realizaciones, el fragmento de exendina es un fragmento de exendina-4. En algunas realizaciones, el análogo de exendina tiene al menos 70 %, por ejemplo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o incluso mayor identidad con exendina-4. Son particularmente útiles para estas enfermedades compuestos descritos en el presente documento que tienen actividad reductora de glucosa (por ejemplo exendina-4 o sus fragmentos o análogos ligados a un ABD), que tienen reducción del peso corporal o reducción de la actividad de consumo de alimentos, retardo del vaciado gástrico, reducción del glucagón en plasma o mejora de la movilidad intestinal. El polipéptido modificado genéticamente puede incluir solamente exendina, o análogo o fragmento de la misma, como un dominio hormonal.

35 La enfermedad o el trastorno puede ser diabetes, sobrepeso, obesidad, dislipidemia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de hígado graso, SBS, hiperlipidemia, enfermedad de Parkinson o enfermedad cardiovascular u otras enfermedades descritas en el presente documento. El polipéptido modificado genéticamente puede incluir una exendina o un fragmento o análogo de la misma. En consecuencia, el polipéptido modificado genéticamente puede tener una de las siguientes estructuras: HD1 ABD o HD1 L1 ABD. En algunas realizaciones, la exendina es exendina-4. En algunas realizaciones, el fragmento de exendina es un fragmento de exendina-4. En algunas realizaciones, el análogo de exendina tiene al menos 70 %, por ejemplo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o incluso mayor identidad con exendina-4. Son particularmente útiles para estas enfermedades compuestos descritos en el presente documento que tienen actividad reductora de glucosa (por ejemplo exendina-4 o sus fragmentos o análogos ligados a un ABD), que tienen reducción del peso corporal o reducción de la actividad de consumo de alimentos, una reducción de HbA1c, retardo del vaciado gástrico, reducción del glucagón en plasma o mejora de la movilidad intestinal.

40 Las enfermedades y trastornos adicionales que pueden tratarse por los compuestos y métodos descritos en el presente documento incluyen diabetes inducida por esteroides, diabetes inducida por tratamiento del VIH, diabetes autoinmunitaria latente en adultos (LADA), esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), desconocimiento de la hipoglucemia (HU), enfermedad pulmonar restrictiva incluyendo sarcoidosis y síndrome metabólico X. El polipéptido modificado genéticamente puede incluir una exendina o fragmento o análogo de la misma. En consecuencia, el polipéptido modificado genéticamente puede tener una de las siguientes estructuras: HD1-ABD o HD1-L1-ABD. En algunas realizaciones, la exendina es exendina-4. En algunas

realizaciones, el fragmento de exendina es un fragmento de exendina-4. En algunas realizaciones, el análogo de exendina tiene al menos 70 %, por ejemplo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o incluso mayor identidad con exendina-4. Son particularmente útiles para estas enfermedades compuestos descritos en el presente documento que tienen actividad reductora de glucosa (por ejemplo exendina-4 o sus fragmentos o análogos ligados a un ABD), que tienen reducción de peso corporal o reducción de la actividad de consumo de alimentos, retardo del vaciado gástrico, reducción de HbA1c, reducción del glucagón en plasma o mejora de la movilidad intestinal. El polipéptido modificado genéticamente puede incluir solamente exendina, o análogo o fragmento de la misma, como un dominio hormonal. La enfermedad o el trastorno puede ser diabetes, sobrepeso, obesidad, dislipidemia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de hígado graso, hiperlipidemia, enfermedad de Parkinson o enfermedad cardiovascular u otras enfermedades descritas en el presente documento.

Las enfermedades y los trastornos adicionales que pueden tratarse por los compuestos y métodos descritos en el presente documento incluyen diabetes inducida por esteroides, diabetes inducida por tratamiento de VIH, diabetes autoinmunitaria latente en adultos (LADA), esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), desconocimiento de la hipoglucemia (HU), enfermedad pulmonar restrictiva incluyendo sarcoidosis y síndrome metabólico X. Son particularmente útiles para estas enfermedades los compuestos descritos en el presente documento que tienen actividad reductora de la glucosa (por ejemplo exendina-4 o sus fragmentos o análogos ligados a un ABD).

V. Ensayos

Están disponibles en general para los expertos en la materia métodos para la producción y el ensayo de polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento. Además, se describen métodos específicos en el presente documento así como en las publicaciones de patente y otras referencias citadas en el presente documento.

Ensayos funcionales y de unión del receptor de GLP-1: la actividad y afinidad de unión del receptor de GLP-1 puede medirse en cualquiera de varios métodos conocidos. Por ejemplo, en un método la actividad de unión se mide usando un ensayo de desplazamiento de unión en el que la fuente de receptor es membranas celulares RINm5F, y el ligando es [¹²⁵I]GLP-1 o exendina yodada (1-39) o exendina yodada (9-39). Se incuban membranas celulares RINm5F homogeneizadas en tampón HEPES 20 mM con 40.000 cpm de indicador [¹²⁵I]GLP-1 (o exendina), y diversas concentraciones del compuesto de ensayo durante 2 horas a 23 °C con mezcla constante. Las mezclas de reacción se filtran a través de almohadillas de filtro de vidrio preempapadas con solución PEI 0,3 % y se aclaran con solución salina tamponada con fosfato helada. Los recuentos unidos se determinan usando un contador de centelleo. Se calculan las afinidades de unión usando software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Pueden realizarse ensayos *in vitro* con respecto a activación del receptor de GLP-1 funcional usando métodos y células y tejidos conocidos. Por ejemplo, la estimulación por exendina-4 de células portadoras de receptor de GLP-1 puede inducir un aumento en la activación de adenilato ciclasa, síntesis de AMPc, despolarización de membrana, aumento del calcio intracelular y aumento de la secreción de insulina inducida por glucosa. Véase por ejemplo, Holz *et al.*, 1995, J. Biol. Chem. 270(30): 17749-57. Pueden usarse ensayos basados en células usando la línea celular rMTC 6-23 (clon 6) para determinar la actividad agonista del receptor de GLP-1 de un compuesto basándose en el AMPc generado. En una realización del bioensayo la actividad agonista del receptor de GLP-1 de un compuesto se determina de forma cuantitativa por correlaciones con la producción de AMPc en ensayos basados en células con células 6-23 (clon 6). El ensayo basado en células usa células 6-23 (clon 6) vivas. Las células 6-23 (clon 6) están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo como ATCC® n.º CRL-1607™ y la Colección Europea de Cultivos Celulares como ECACC n.º 87042206. En otra realización el ensayo basado en células es un ensayo de fluorescencia resuelto en el tiempo homogéneo (HTRF®). Están disponibles en el mercado kits de HTRF® de Cisbio International (Bedford, Mass.). Se conocen en la técnica métodos para usar kits de HTRF® y los kits incluyen en general manuales de instrucciones, por ejemplo, sobre cómo preparar muestras, patrones, curvas de calibración y realizar experimentos. Se describen ensayos basados en células de fluorescencia resuelta en el tiempo homogéneos en la Patente de Estados Unidos n.º 5.527.684, y el Documento n.º de Referencia 62AM4PEB rev02 (agosto de 2007) disponible de Cisbio HTRF® Product Center. Véase www.htrf.com/products/gper/camp/. En un método preferido el bioensayo usa las células de carcinoma de tiroides de rata 6-23 (clon 6) en un ensayo basado en células usando el kit de 1.000 ensayos de AMPc dinámico 2 de HTRF®, disponible de Cisbio con el n.º de Catálogo 62AM4PEB. Los patrones de HTRF® y calibraciones se preparan siguiendo las instrucciones del kit. Pueden realizarse ensayos con o sin la presencia de albúmina.

Pueden realizarse ensayos *in vivo* con respecto a la actividad y duración de la acción y farmacocinética usando métodos conocidos. Por ejemplo, puede realizarse duración usando un ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) en el que el fármaco se administra al sujeto en un punto temporal deseado antes de administrarse la glucosa por vía oral (para medir la duración de acción del fármaco; OGTT DOA) y se miden los niveles de glucosa en sangre (por ejemplo fácilmente realizado en ratones). También puede medirse la actividad y duración usando un ensayo de tolerancia a la glucosa intravenosa (IVGTT) en el que el fármaco se administra al sujeto en un punto temporal deseado antes de administrarse la glucosa IV (IVGTT DOA) y se miden los niveles de glucosa en sangre (por ejemplo puede realizarse fácilmente en ratas). Los compuestos modificados genéticamente preferidos tienen un

efecto deseado en la glucosa en sangre de al menos 24 horas de duración después de una única dosis de fármaco, preferentemente al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días y al menos 1 semana después de proporcionarse la dosis individual del fármaco.

5 Por ejemplo, se inyecta polipéptido de ensayo por vía subcutánea a $t=0$ inmediatamente después de una muestra de línea basal en ratones hembra NIH/Swiss. Se toman muestras de sangre en periodos temporales deseados tales como $t= 2, 4$ y 8 horas durante el día 1 y después diariamente hasta el día 5 o hasta el día 7 o más. Se mide la glucosa en sangre con un OneTouch® Ultra® (LifeScan, Inc., a Johnson & Johnson Company, Milpitas, CA). Para la determinación de una duración de actividad (DOA), tal como para la actividad de control de glucosa de un fármaco, puede realizarse un OGTT o IVGTT en el punto deseado después de la administración del fármaco. También puede medirse el peso corporal, así como el consumo de alimentos, u otro parámetro farmacológico o farmacocinético. Por ejemplo, se alojan en grupo ratones hembra NIH/Swiss (8-20 semanas de edad) con un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas con las luces encendidas a las 0600. Estuvieron disponibles agua y una dieta de pienso de ratón en microgránulos convencional a voluntad, excepto donde se indique. La mañana del experimento, los animales se dividen en grupos experimentales y se someten a ayunas comenzando a aproximadamente 0630 horas. En un estudio típico, $n=2$ jaulas con 3 ratones/jaula. En el momento=0 minutos, se toma una muestra de glucosa en sangre y se sigue inmediatamente de una inyección intraperitoneal de vehículo o compuesto en una cantidad que varía de aproximadamente 1 nmol/kg a 25 nmol/kg. La glucosa en sangre puede medirse a los 30, 60, 120, 180 y 240 minutos y diariamente durante una semana o más después de la dosis individual. En una variación del experimento, se proporcionan dosis diariamente o incluso semanalmente durante un periodo más largo tal como 14 o 28 días. Se calcula el porcentaje de pretratamiento dividiendo la glucosa en sangre en el punto temporal medido, por ejemplo 60 minutos o 1 día, por la glucosa en sangre en el momento=0 minutos. Se identificaron efectos de tratamiento significativos por ANOVA ($p<0,05$). Cuando existe una diferencia significativa, los medios de ensayo se comparan con el medio de control usando ensayo de Dunnett (Prism® v. 4.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). La glucosa en sangre puede medirse con un OneTouch® Ultra® (LifeScan, Inc., a Johnson & Johnson Company, Milpitas, CA). * $p<0,05$ frente a control de vehículo; ANOVA, ensayo de Dunnett. También pueden medirse otros parámetros.

30 Ensayo *in vivo* para inhibición del consumo de alimentos: los polipéptidos modificados genéticamente pueden ensayarse con respecto a su duración y alcance de la supresión del apetito y con respecto a su duración y alcance del efecto sobre la pérdida de peso corporal en diversos métodos conocidos. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ensayarse con respecto a supresión del apetito en el ensayo de consumo de alimentos de ratón y con respecto a su efecto en el aumento de peso corporal en ratones con obesidad inducida por dieta (DIO). Se describe posteriormente un protocolo experimental para dichos ensayos.

35 Por ejemplo, se alojan en grupo ratones NIH/Swiss hembra (8-24 semanas de edad) con un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 horas con encendido de las luces a las 0600. Está disponible agua y una dieta de pienso de ratón en micropartículas convencional a voluntad, excepto donde se indique. Los animales se someten a ayunas comenzando aproximadamente a las 1500 horas, 1 día antes del experimento. La mañana del experimento, los animales se dividen en grupos experimentales. En un estudio típico: $n=4$ jaulas con 3 ratones/jaula. En tiempo = 0 min, se proporciona a todos los animales una inyección intraperitoneal de vehículo o compuesto de ensayo, típicamente en una cantidad que varía de aproximadamente 2 nmol/kg a 75 nmol/kg, e inmediatamente se les proporciona una cantidad previamente pesada (10-15 g) de pienso convencional. Se retira el alimento y se pesa en diversos tiempos, típicamente 30, 60 y 120 minutos o más, tal como diariamente, para determinar la cantidad de alimento consumido (Morley, Flood *et al.*, 1994, Am. J. Physiol. 267: R178-R184). Se calcula el consumo de alimentos restando el peso de la comida restante en el punto temporal de, por ejemplo, 30 o 60 minutos a partir del peso del alimento proporcionado inicialmente en tiempo = 0. Se identifican efectos de tratamiento significativos por ANOVA ($p<0,05$). Cuando exista una diferencia significativa, las medias de ensayo se comparan con la media de control usando ensayo de Dunnett (Pris® v. 2.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). También puede medirse el peso corporal.

50 Ensayos de peso corporal, redistribución de grasas y masa corporal magra: Se pueden realizar también ensayos con respecto a peso corporal y efectos realizados de la siguiente manera. La obesidad inducida por dieta (DIO) en la rata Sprague-Dawley es un modelo valioso para el estudio de la obesidad y la regulación de la homeostasis de energía. Estas ratas se desarrollaron a partir de una línea de ratas (CrI:CD®(SD)BR) que son propensas a hacerse obesas con una dieta relativamente alta en grasas y energía. Véase, por ejemplo, Levin, 1994, Am. J. Physiol. 267: R527-R535, Levin *et al.*, 1997, Am. J. Physiol. 273:R725-R730. Se obtienen ratas macho DIO de Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA). Las ratas se alojan individualmente en jaulas de caja de zapatos a 22 °C en un ciclo de luz y oscuridad de 12/12 horas. Las ratas se mantienen a voluntad con una dieta moderadamente alta en grasas (32 % kcal de grasa; Research Diets D1226B). Los animales consiguen típicamente un peso corporal medio de aproximadamente 500 g. Las ratas DIO de Levin se habitúan al ambiente enjaulado durante 7 días. Durante las 3 noches de habituación, los animales reciben una única inyección intraperitoneal (IP) de vehículo. Los días del ensayo, se administra a las ratas una única inyección IP de compuesto o vehículo (por ejemplo DMSO 10 %) al comienzo del ciclo de oscuridad. El consumo de alimentos se mide por un sistema de medición de consumo de alimentos automático (BioDAQ, Research Diets) a intervalos de 5 s a lo largo del transcurso del estudio. El peso corporal se registra cada noche.

La composición corporal puede medirse antes de y después del tratamiento farmacológico usando RMN (Medical Systems, Houston, TX). Para mediciones de composición corporal, las ratas se colocan brevemente (~1 min) en un tubo de plexiglás bien ventilado que se insertó después en una máquina de RMN de roedores especializada. Esto permitió el cálculo de cambios en gramos reales de grasa y tejido magro seco (por ejemplo, gramos de grasa corporal después de tratamiento – gramos de grasa corporal en línea basal = cambio en gramos de grasa corporal) y cambios en el % de composición corporal para tejido graso y magro seco (por ejemplo, % de grasa corporal después del tratamiento - % de grasa corporal en línea basal = cambio en % de grasa corporal). Todos los datos se representan como media \pm ETM. Se usan análisis de varianza (ANOVA) y ensayos post-hoc para ensayar con respecto a diferencias de grupos. Un P-valor <0,05 se considera significativo. Se realizan análisis estadísticos y representación gráfica usando PRISM®4 para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Los gráficos y los resultados se presentan típicamente como cambios corregidos para vehículo en el porcentaje de peso corporal, grasa corporal y cambios en la proteína corporal.

VI. Composiciones farmacéuticas

En un aspecto se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen compuestos descritos en el presente documento en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, vehículo). La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable”, como se usa en el presente documento se refiere a excipientes farmacéuticos, por ejemplo, sustancias vehículos farmacéuticamente, fisiológicamente, aceptables orgánicas o inorgánicas adecuadas para aplicación entérica o parenteral que no reaccionan de forma deletérea con el agente activo. Los vehículos farmacéuticamente adecuados incluyen agua, soluciones salinas (por ejemplo, solución de Ringer y similares), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, y polivinilpirrolidona. Dichas preparaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes adyuvantes tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes y/o aromáticas y similares que no reaccionan de forma deletérea con los compuestos de la invención.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un polipéptido modificado genéticamente como se describe en el presente documento en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica oral, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica de larga duración. La expresión “de larga duración” en el contexto de la administración de una composición farmacéutica se refiere a la duración de acción. En consecuencia, una composición farmacéutica de larga duración puede administrarse a intervalos de, por ejemplo, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes o incluso más. En una realización, la administración es dos veces al día (es decir, “dos veces diarias”). En una realización preferida, la administración es una vez al día (es decir, “una vez diaria”). En realizaciones más preferidas, la administración es una vez a la semana (es decir, “una vez semanal”). En algunas realizaciones, el polipéptido modificado genéticamente se selecciona de los polipéptidos modificados genéticamente expuestos en las Tablas 2, 3A y 3B en el presente documento. En algunas realizaciones, el polipéptido modificado genéticamente se selecciona de los polipéptidos modificados genéticamente expuestos en la Tabla 2 en el presente documento.

A. Formulaciones

Los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento pueden administrarse solos o pueden co-administrarse a un sujeto. Se entiende que la co-administración incluye administración simultánea o secuencial de los compuestos individualmente o en combinación (más de un compuesto). Por ejemplo, se ha descubierto que la obesidad puede tratarse beneficiosamente con una terapia de combinación incluyendo leptina (por ejemplo, metreleptina) y una amilina (por ejemplo, pramlintida). Véase, por ejemplo, Solicitud Publicada de Estados Unidos n.º 2008/0207512. En consecuencia, un polipéptido modificado genéticamente descrito en el presente documento que incluye un ABD y un compuesto de exendina útil para el tratamiento de, por ejemplo, obesidad y sobrepeso, pueden administrarse solos para conseguir dicho tratamiento o co-administrarse con una leptina o un agonista de leptina, por ejemplo, metreleptina y/o una amilina o un agonista de amilina, por ejemplo pramlintida.

En algunas realizaciones, las formulaciones y los métodos descritos en el presente documento proporcionan además que el polipéptido modificado genéticamente de exendina, análogo de exendina o agonista de análogo de exendina se co-administre con uno o más agentes anti-diabéticos, tales como agentes anti-hiperglucémicos, por ejemplo insulina (incluyendo insulinas regulares, de acción corta, de acción larga y basales), amilinas, pramlintida, metformina y tiazolidinedionas (incluyendo rosiglitazona y pioglitazona).

En algunas realizaciones, las formulaciones y los métodos descritos en el presente documento, proporcionan además que la exendina, el análogo de exendina o el polipéptido modificado genéticamente agonista de análogo de exendina se co-administre con uno o más agentes reductores de colesterol y/o triglicéridos. Los agentes ejemplares incluyen inhibidores de HMG CoA reductasa (por ejemplo, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina); secuestrantes de ácido biliar (por ejemplo, colesvelam, colestiramina, colestipol);

fibratos (por ejemplo, fenofibrato, clofibrato, gemfibrozilo); ezetimibe, ácido nicotínico, probucol, una combinación de lovastatina/niacina; una combinación de atorvastatina/amlodipina; y una combinación de simvastatina/ezetimibe.

5 La presente divulgación proporciona la composición para uso como un medicamento, es decir, para uso en terapia, ya que el compuesto de exendina es un compuesto terapéuticamente activo y sorprendentemente conserva actividad cuando se fusiona con ABD. También se contemplan específicamente composiciones que incluyen un polipéptido modificado genéticamente, bien en forma líquida o bien en forma seca, y opcionalmente al menos un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable y se ejemplifican en el presente documento.

10 La composición tiene la capacidad de asociarse con albúmina *in vivo* o *in vitro*. En ciertos casos, puede ser beneficioso formar un complejo de la composición con albúmina fuera de un organismo vivo, es decir, añadir albúmina exógena a la composición. Dicha composición puede liofilizarse, proporcionando una formulación que es adecuada para almacenamiento a temperatura ambiente. Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona una composición como se ha definido anteriormente que incluye además albúmina, tal como albúmina de suero humano, y que puede opcionalmente estar en forma seca.

15 Puede conseguirse co-administración administrando por separado la exendina, el agonista de exendina o el polipéptido modificado genéticamente agonista de análogo de exendina con el segundo agente, o administrando una única formulación farmacéutica que incluye la exendina, el agonista de exendina o el polipéptido modificado genéticamente agonista de análogo de exendina y el segundo agente. Se conocen en general en la técnica regímenes de dosificación apropiados para los segundos agentes.

20 Las preparaciones también pueden co-administrarse, cuando se desee, con otras sustancias activas (por ejemplo para reducir la degradación metabólica) como se conoce en la técnica u otros agentes terapéuticamente activos. Puede administrarse un polipéptido modificado genéticamente de exendina descrito en el presente documento con otros agentes anti-diabetes o anti-obesidad activos, tales como leptina o agonistas de leptina o amilina o compuestos agonistas de amilina, por ejemplo, las amilinas, incluyendo davalintida y sus análogos.

25 Amilinas. La amilina es una hormona peptídica sintetizada por células β pancreáticas que se co-secreta con insulina en respuesta al consumo de nutrientes. La secuencia de amilina está altamente conservada entre especies de mamífero, con similitudes estructurales con el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), las calcitoninas, las intermedinas, y la adrenomedulina, como se conoce en la técnica. Las acciones glucorreguladoras de amilina complementan las de insulina regulando la tasa de aparición de glucosa en la circulación mediante supresión de la secreción de glucagón estimulada por nutrientes y la ralentización del vaciado gástrico. En pacientes tratados con insulina con diabetes, la pramlintida, un análogo sintético y equipolente de la amilina humana, reduce las excursiones de glucosa postprandial suprimiendo la secreción de glucagón postprandial elevado de forma inapropiada y ralentizando el vaciado gástrico. A continuación se muestran las secuencias de amilina de rata, amilina humana y pramlintida:

30
35
40 KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY (SEC ID N°: 6);
KCNTATCATQRLANFLVHSSNCFGAILSTNVGSNTY (SEC ID N°: 7);
KCNTATCATQRLANFLVHSSNCFGPILPPTNVGSNTY (SEC ID N°: 8).

45 Davalintida. La davalintida, también conocida como "AC-2307" es un agonista de amilina potente útil en el tratamiento de una diversidad de indicaciones de enfermedad. Véase documentos WO 2006/083254 y WO 2007/114838. La davalintida es un péptido quimérico, que tiene una región de bucle N terminal de amilina o calcitonina y análogos de los mismos, una región alfa-helicoidal de al menos una parte de una región alfa-helicoidal de calcitonina o análogos de la misma o una región alfa-helicoidal que tiene una parte de una región alfa-helicoidal de amilina y una región alfa-helicoidal de calcitonina o análogo de la misma, y una región de cola C terminal de amilina o calcitonina. A continuación se muestran las secuencias de calcitonina humana, calcitonina de salmón y davalintida:

50
55 CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP (SEC ID N°: 9);
CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP (SEC ID N°: 10);
KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSENTY (SEC ID N°: 11).

60 Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que las amilinas y la davalintida, y fragmentos y análogos de las mismas, pueden requerir amidación C terminal para inducir una respuesta biológica completa. Se entiende que los compuestos de amilina tales como los descritos en el presente documento que incluyen amilinas y/o davalintida, y fragmentos de análogos de los mismos, pueden amidarse en el extremo C terminal.

65 Los "compuestos agonistas de amilina" incluyen péptidos de amilina nativos, péptidos análogos de amilina y otros compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas) que tienen actividad agonista de amilina. Los "compuestos agonistas de amilina" pueden derivarse de fuentes naturales, pueden ser sintéticos, o pueden derivar de técnicas de ADN recombinante. Los compuestos agonistas de amilina tienen actividad de unión al receptor de agonista de amilina y pueden incluir aminoácidos (por ejemplo, naturales, no naturales o una combinación de los mismos),

miméticos peptídicos, restos químicos, y similares. El experto en la materia reconocerá compuestos agonistas de amilina usando ensayos de unión a receptor de amilina o midiendo la actividad agonista de amilina en ensayos de músculo sóleo. En una realización, los compuestos agonistas de amilina tendrán una CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, o aproximadamente 50 nM o menos, en un ensayo de unión a receptor de amilina, tal como el descrito en el presente documento, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.686.411, y la Publicación de Estados Unidos n.º 2008/0176804. En una realización, los compuestos agonistas de amilina tendrán una CE_{50} de aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 15 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos o aproximadamente 5 nM o menos en un ensayo de músculo sóleo, tal como el descrito en el presente documento y en la Patente de Estados Unidos n.º 5.686.411. En una realización, el compuesto agonista de amilina tiene al menos 90 % o 100 % de identidad de secuencia con ^{25,28,29}Pro-amilina humana. En una realización, el compuesto agonista de amilina es una quimera peptídica de amilina (por ejemplo, amilina humana, amilina de rata y similares) y calcitonina (por ejemplo, calcitonina humana, calcitonina de salmón y similares). También se describen compuestos agonistas de amilina adecuados y ejemplares en la Publicación de Estados Unidos n.º 2008/0274952.

Cuando se co-administran con otro agente activo, los compuestos pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, juntos o formulados por separado. Ya que los compuestos modificados genéticamente en el presente documento tienen de forma inherente acción larga, son adecuados para administración una vez al día, una vez a la semana o más. En consecuencia, el otro agente puede administrarse en una o múltiples dosis, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, una vez a la semana, según sea necesario, durante el periodo de dosificación para el polipéptido modificado genéticamente de exendina, por ejemplo una vez a la semana.

Se han presentado formulaciones de uso individual y múltiple de otros agentes tales como compuestos de amilina. Por ejemplo, se ha formulado pramlintida para y se ha administrado con éxito para una administración una vez, dos veces y tres veces al día para tratar la diabetes y para tratar la obesidad.

Estos compuestos farmacéuticos pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las desveladas en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Véase también Wang *et al.* (1988) J. of Parenteral Sci. and Tech., Technical Report n.º 10, Sup. 42:2 S.

En general, los polipéptidos modificados genéticamente pueden formularse en una composición farmacéutica estable, segura, para administración a un paciente. Las formulaciones farmacéuticas contempladas para su uso en los métodos de la invención pueden incluir aproximadamente 0,01 a 1,0 % (p/v), en ciertos casos 0,05 a 1,0 %, del polipéptido modificado genéticamente, aproximadamente 0,02 a 0,5 % (p/v) de un tampón de acetato, fosfato, citrato o glutamato permitiendo un pH de la composición final de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0; de aproximadamente 1,0 a 10 % (p/v) de un carbohidrato o tonificante de alcohol polihídrico y, opcionalmente, aproximadamente 0,005 a 1,0 % (p/v) de un conservante seleccionado del grupo de m-cresol, alcohol bencílico, metil, etil, propil y butil parabenos y fenol. Dicho conservante se incluye en general si el péptido formulado va a incluirse en un producto de uso múltiple.

En realizaciones particulares, una formulación farmacéutica de los presentes polipéptidos modificados genéticamente puede contener un intervalo de concentraciones del compuesto o los compuestos, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 98 % p/p, o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 98 % p/p, o preferentemente entre 80 % y 90 % p/p, o preferentemente entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 50 % p/p, o más preferentemente entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 25 % p/p en estas realizaciones. Puede usarse una cantidad suficiente de agua para inyección para obtener la concentración deseada de solución.

También pueden estar presentes agentes tonificantes adicionales tales como cloruro sódico, así como otros excipientes conocidos, si se desea. En algunos casos, dichos excipientes son útiles en el mantenimiento de la tonicidad general del compuesto. Puede incluirse un excipiente en las formulaciones descritas en la actualidad a diversas concentraciones. Por ejemplo, puede incluirse un excipiente en el intervalo de concentración de aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 20 % p/p, preferentemente entre aproximadamente 0,02 % y 0,5 % p/p, de aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 10 % p/v, o de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % p/p. Además, de forma similar a las presentes formulaciones en sí mismas, puede incluirse un excipiente en forma sólida (incluyendo en polvo), líquida, semisólida o en gel.

Las formulaciones farmacéuticas pueden estar compuestas de diversas formas, por ejemplo, sólida, líquida, semisólida o líquida. Se entiende que el término "sólido", como se usa en el presente documento, abarca todos los usos normales de este término incluyendo, por ejemplo, polvos y formulaciones liofilizadas. Las formulaciones descritas en la actualidad pueden liofilizarse.

Las expresiones tampón, solución de tampón y solución tamponada, cuando se usan en referencia a la concentración de ion hidrógeno o pH, se refieren a la capacidad de un sistema, particularmente una solución acuosa, para resistir un cambio de pH tras añadir ácido o álcali, o en dilución con un disolvente. Es característica de soluciones tamponadas, que experimentan cambios pequeños de pH tras la adición de ácido o base, la presencia de

un ácido débil y una sal del ácido débil, o una base débil y una sal de la base débil. Un ejemplo del anterior sistema es ácido acético y acetato sódico. El cambio de pH es ligero siempre que la cantidad de hidronio o ion hidroxilo añadida no exceda la capacidad del sistema de tampón para neutralizarlo.

5 Como se describe en el presente documento, son adecuadas una diversidad de vehículos líquidos para su uso en las formulaciones de polipéptidos modificados genéticamente, por ejemplo, agua o una mezcla o suspensión de disolvente acuoso/orgánico.

10 La estabilidad de una formulación de polipéptido modificado genéticamente para su uso como se describe en el presente documento se potencia manteniendo el pH de la formulación en un intervalo determinado por métodos conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, el pH de la formulación se mantiene en el intervalo de aproximadamente 3,5 a 5,0, o de aproximadamente 3,5 a 6,5, en algunas realizaciones de aproximadamente 3,7 a 4,3, o de aproximadamente 3,8 a 4,2. En algunas realizaciones, el pH puede ser de aproximadamente 4,0, aproximadamente 5,0, aproximadamente 6,0, aproximadamente 7,0, aproximadamente 8,0, aproximadamente 9,0 o incluso mayor. En algunas realizaciones, el pH puede estar en el intervalo fisiológico, pH 6-8, preferentemente pH 7-7,6.

20 En ciertas realizaciones, el tampón con el polipéptido modificado genéticamente es un tampón de acetato (preferentemente a una concentración de formulación final de aproximadamente 1-5 a aproximadamente 60 mM), tampón de fosfato (preferentemente a una concentración de formulación final de aproximadamente 1-5 a aproximadamente 30 mM) o tampón de glutamato (preferentemente a una concentración de formulación final de aproximadamente 1-5 a aproximadamente 60 mM). En algunas realizaciones, el tampón es acetato (preferentemente a una concentración de formulación final de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mM).

25 Puede incluirse un estabilizador en las formulaciones pero no se necesita necesariamente. Si se incluye, sin embargo, un estabilizador útil en la práctica de la presente invención es un carbohidrato o un alcohol polihídrico. Un estabilizante adecuado útil en la práctica de la presente invención es de aproximadamente 1,0 a 10 % (p/v) de un carbohidrato o alcohol polihídrico. Los alcoholes polihídricos y carbohidratos comparten el mismo elemento en sus cadenas principales, es decir, -CHOH—CHOH--, que es responsable de estabilizar las proteínas. Los alcoholes polihídricos incluyen compuestos tales como sorbitol, manitol, glicerol y polietilenglicoles (PEG). Estos compuestos son moléculas de cadena sencilla. Los carbohidratos, tales como manosa, ribosa, sacarosa, fructosa, trehalosa, maltosa, inositol y lactosa, por otro lado, son moléculas cíclicas que pueden contener un grupo ceto o aldehído. Se ha demostrado que estas dos clases de compuestos son eficaces en la estabilización de proteína contra la desnaturalización provocada por temperatura elevada y por congelación-descongelación o procesos de liofilización.

30 Los carbohidratos adecuados incluyen: galactosa, arabinosa, lactosa o cualquier otro carbohidrato que no tenga un efecto adverso en un paciente diabético, es decir, el carbohidrato no se metaboliza para formar concentraciones inaceptablemente grandes de glucosa en sangre. Dichos carbohidratos se conocen en la técnica como adecuados para diabéticos. La sacarosa y la fructosa son adecuadas para su uso con el compuesto en aplicaciones no diabéticas (por ejemplo, tratar la obesidad).

40 En ciertas realizaciones, si se incluye un estabilizador, el compuesto se estabiliza con un alcohol polihídrico tal como sorbitol, manitol, inositol, glicerol, xilitol, y copolímero de polipropileno/etilenglicol, así como diversos polietilenglicoles (PEG) de peso molecular 200, 400, 1450, 3350, 4000, 6000, 8000 e incluso mayor. El manitol es el alcohol polihídrico preferido en algunas realizaciones. Otro elemento útil de las formulaciones liofilizadas de la presente invención es el mantenimiento de la tonicidad de las formulaciones liofilizadas descritas en el presente documento con el mismo componente de formulación que actúa para mantener su estabilidad. En algunas realizaciones, el monitor es el alcohol polihídrico preferido usado para este fin.

50 La Farmacopea de Estados Unidos (USP) indica que deben añadirse agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones contenidas en recipientes de dosis múltiple. Deben estar presentes en concentración adecuada en el momento de uso para evitar la multiplicación de microorganismos introducidos involuntariamente en la preparación mientras que se extrae una parte de los contenidos con una aguja hipodérmica y jeringa, o usando otros medios invasivos para suministro, tales como inyectores de bolígrafo. Los agentes antimicrobianos deberían evaluarse para asegurar la compatibilidad con todos los otros componentes de la fórmula, y su actividad debería evaluarse en la fórmula total para asegurar que un agente particular que es eficaz en una formulación no sea ineficaz en otra. No es poco común encontrar que un agente antimicrobiano particular sea eficaz en una formulación pero no eficaz en otra formulación.

60 Un conservante es, en el sentido farmacéutico habitual, una sustancia que evita o inhibe el crecimiento microbiano y puede añadirse a formulaciones farmacéuticas para este fin para evitar el deterioro consecuente de la formulación por microorganismos. Aunque la cantidad del conservante no es grande, puede afectar no obstante a la estabilidad general del péptido.

65 Aunque el conservante para su uso en las composiciones farmacéuticas puede variar de 0,005 a 1,0 % (p/v), en algunas realizaciones el intervalo para cada conservante, solo o en combinación con otros, es: alcohol bencílico (0,1-1,0 %), o m-cresol (0,1-0,6 %), o fenol (0,1-0,8 %) o combinación de metil (0,05-0,25 %) y etil o propil o butil

(0,005 %-0,03 %) parabenos. Los parabenos son alquil ésteres inferiores de ácido para-hidroxibenzoico. Se expone una descripción detallada de cada conservante en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (misma referencia).

5 Los polipéptidos modificados genéticamente pueden no tener una tendencia a adsorberse en el vidrio en un recipiente de vidrio cuando están en una forma líquida, por lo tanto, puede no requerirse un tensioactivo para estabilizar adicionalmente la formulación farmacéutica. Sin embargo, con respecto a compuestos que no tienen dicha tendencia cuando están en forma líquida, debería usarse un tensioactivo en su formulación. Estas formulaciones pueden después liofilizarse. Los tensioactivos provocan frecuentemente desnaturalización de proteínas, tanto de rotura hidrófoba como por separación de enlaces salinos. Concentraciones relativamente bajas de tensioactivo pueden ejercer una potente actividad desnaturalizante, debido a las fuertes interacciones entre restos tensioactivos y los sitios reactivos en proteínas. Sin embargo, el uso sensato de esta interacción puede estabilizar proteínas frente a la desnaturalización interfacial o superficial. Los tensioactivos que podrían estabilizar adicionalmente el polipéptido modificado genéticamente pueden estar presentes opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 0,3 % (p/v) de la formulación total e incluyen polisorbato 80 (es decir, polioxietileno(20) sorbitán monooleato), CHAPS® (es decir, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-propanosulfonato), Brij® (por ejemplo, Brij® 35, que es (polioxietileno (23) lauril éter), poloxámero u otro tensioactivo no iónico.

20 También puede ser deseable añadir cloruro sódico u otra sal para ajustar la tonicidad de la formulación farmacéutica, dependiendo del tónico seleccionado. Sin embargo, esto es opcional y depende de la formulación particular seleccionada. Las formulaciones parenterales preferentemente pueden ser isotónicas o sustancialmente isotónicas.

25 Un vehículo preferido para productos parenterales es agua. Puede prepararse agua de calidad adecuada para administración parenteral bien por destilación o bien por ósmosis inversa. El agua para inyección es el vehículo acuoso preferido para su uso en las formulaciones farmacéuticas.

30 Es posible que puedan estar presentes otros ingredientes en las formulaciones farmacéuticas. Dichos ingredientes adicionales puede incluir, por ejemplo, agentes humectantes, emulsionantes, aceites, antioxidantes, agentes de masificación, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Adicionalmente, las soluciones poliméricas, o mezclas con polímeros proporcionan la oportunidad de liberación controlada del péptido. Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar de forma adversa a la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente invención.

35 Los recipientes también son una parte integral de la formulación de una inyección y pueden considerarse un componente, ya que no hay ningún recipiente que no sea totalmente inerte, o no afecte de alguna manera al líquido que contiene, particularmente si el líquido es acuoso. Por lo tanto, la selección de un recipiente para una inyección particular debe basarse en una consideración de la composición del recipiente, así como de la solución, y el tratamiento al que se someterá. También puede minimizarse la adsorción del péptido a la superficie de vidrio del vial, si es necesario, mediante el uso de vidrio de borosilicato, por ejemplo, vidrio de borosilicato de Tipo I de Wheaton n.º 33 (Tipo I de Wheaton-33) o su equivalente (Wheaton Glass Co.). Otros proveedores de viales y cartuchos de vidrio de borosilicato similares aceptables para fabricación incluyen Kimbel Glass Co., West Co., Bunder Glas GMBH y Form a Vitrum. Las propiedades biológicas y químicas del compuesto pueden estabilizarse por formulación y liofilización en un vial de suero de borosilicato de Tipo I de Wheaton-33 hasta una concentración final de 0,1 mg/ml y 10 mg/ml del compuesto en presencia de manitol 5 % y Tween 80 0,02 %.

50 Para formulaciones para suministrar por inyección, para permitir la introducción de una aguja desde una jeringa hipodérmica en un vial de dosis múltiple y permitir volver a sellar en cuanto se retire la aguja, el extremo abierto de cada vial preferentemente se sella con un cierre de tapón de goma sujeto por una banda de aluminio.

55 Pueden usarse tapones para viales de vidrio, tales como, West 4416/50, 4416/50 (con cara de Teflon) y 4406/40, Abbott 5139 o cualquier tapón equivalente como el cierre para producto farmacéutico para inyección. Para formulaciones que incluyen agentes anti-obesidad peptídicos, estos tapones son compatibles con el péptido así como los otros componentes de la formulación. Los inventores también han descubierto que estos tapones aprueban el ensayo de integridad de tapones cuando se ensayan usando patrones de uso de pacientes, por ejemplo, el tapón puede soportar al menos aproximadamente 100 inyecciones. Como alternativa, el péptido puede liofilizarse en viales, jeringas o cartuchos para reconstitución posterior. Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden cargarse en uno o dos cartuchos con cámaras, o una o dos jeringas con cámaras.

60 Cada uno de los componentes de la formulación farmacéutica descrita anteriormente se conoce en la técnica y se describen en *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Vol. 1, 2ª ed., *Avis et al. Ed.*, Merck Dekker, Nueva York, N.Y. 1992.

65 El proceso de fabricación para las formulaciones líquidas anteriores generalmente implica etapas de formación de compuestos, esterilización por filtración y carga. El procedimiento de formación de compuestos implica la disolución

de ingredientes en un orden específico (conservante seguido de agentes estabilizantes/de tonicidad, tampones y péptidos) o disolución al mismo tiempo.

5 Las formulaciones alternativas, por ejemplo, no parenterales, pueden no requerir esterilización. Sin embargo, si se desea o es necesaria la esterilización, puede usarse cualquier proceso de esterilización adecuado en el desarrollo de la formulación farmacéutica peptídica de la presente invención. Los procesos de esterilización típicos incluyen filtración, vapor (calor húmedo), calor seco, gases (por ejemplo, etilenoóxido, formaldehído, dióxido de cloro, propileno óxido, beta-propiolactona, ozono, cloropicrina, metil bromuro de ácido peracético y similares), exposición a una fuente de radiación y manipulación aséptica. La filtración es el método preferido de esterilización para formulaciones 10 líquidas de la presente invención. La esterilización por filtración implica filtración a través de 0,45 μm y 0,22 μm (1 o 2) que pueden estar conectados en serie. Después de la filtración, la solución se carga en viales o recipientes apropiados.

15 En ciertas realizaciones, los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento se administran de forma periférica a los sujetos. En algunas realizaciones, se pretende que las formulaciones farmacéuticas líquidas de la presente invención sean para administración parenteral. Las vías adecuadas de administración incluyen intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraarticular, intratecal y similares. En algunas realizaciones, se prefiere la vía subcutánea de administración. En ciertas realizaciones, también se prefiere suministro a la mucosa. Estas vías incluyen, pero sin limitación, vías oral, nasal, sublingual, pulmonar y bucal que 20 pueden incluir administración del péptido en forma líquida, semisólida o sólida. Para formulaciones que incluyen polipéptidos modificados genéticamente, la administración por estas vías puede requerir sustancialmente más compuesto para obtener los efectos biológicos deseados debido a la biodisponibilidad reducida en comparación con el suministro parenteral.

25 Además, puede conseguirse el suministro de liberación controlada parenteral formando microcápsulas poliméricas, matrices, soluciones, implantes y dispositivos y administrándolos parenteralmente o por medios quirúrgicos. Se describen ejemplos de formulaciones de liberación controlada en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.368.630, 6.379.704 y 5.766.627. Estas formas de dosificación pueden tener una menor biodisponibilidad debido a la inmovilización de parte del péptido en la matriz polimérica o el dispositivo. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados 30 Unidos n.º 6.379.704, 6.379.703 y 6.296.842.

Los compuestos pueden proporcionarse en forma de dosificación unitaria que contiene una cantidad del polipéptido modificado genéticamente que será eficaz en una o múltiples dosis.

35 Como se reconocerá por los expertos en la materia, una cantidad eficaz del polipéptido modificado genéticamente variará con muchos factores incluyendo la edad y el peso del sujeto, la condición física del sujeto, la afección para tratar y otros factores conocidos en la técnica. Una cantidad eficaz de los polipéptidos modificados genéticamente también variará con la combinación particular administrada. Como se describe en el presente documento, la administración de los polipéptidos modificados genéticamente en combinación puede permitir que una cantidad 40 reducida de cualquiera de los polipéptidos modificados genéticamente administrados sea una cantidad eficaz.

La administración puede ser por vía oral, incluyendo vías transcelular, paracelular o modificada por receptor. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, los polipéptidos modificados genéticamente que contienen una xenodina como se describe en el presente documento están disponibles por vía oral, en parte debido a su tamaño 45 relativamente pequeño y su estabilidad relativa frente a enzimas intestinales. Se ha indicado que las uniones estrechas entre las células intestinales abiertas por potenciadores de la absorción/permeación son de menos de 20 nm de ancho. Véase, por ejemplo, Chao *et al.*, 1998, J. Drug Targeting, 6:37-43. En consecuencia, un polipéptido modificado genéticamente suficientemente pequeño, por ejemplo, de menos de 10 kD o 15 kD) como se describe en el presente documento puede atravesar la pared intestinal y unirse con la albúmina en el sistema porta, obteniendo 50 de este modo acceso a la circulación. El suministro oral de los polipéptidos modificados genéticamente de la presente invención puede ser dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o incluso una vez al mes. Pueden usarse sistemas de suministro oral adecuados para otros péptidos. En una realización, el sistema de suministro oral puede tener un perfil de captación relativamente rápido, por ejemplo de 1 a 4 horas, en cuyo caso la duración de acción inherentemente larga del polipéptido modificado genéticamente proporciona la duración extendida de acción 55 deseada, tal como administración una vez al día o una vez a la semana. La duración de acción puede seleccionarse, por ejemplo, por elección de ABD y su afinidad por albúmina. Aunque sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que mayor afinidad para albúmina producirá tiempos de circulación más largos que proporcionan duración de acción más larga. El suministro oral puede ensayarse usando métodos *in vitro* e *in vivo* conocidos. Por ejemplo, pueden 60 suministrarse a un ratón por sonda oral una solución que contenga un polipéptido modificado genéticamente formulado con o sin un potenciador de la permeación/absorción y/o un inhibidor de la proteasa para ensayar la disponibilidad oral y el efecto de cualquier excipiente añadido. Una o ambas de la farmacodinámica (efectos terapéuticos) y la farmacocinética (propiedades farmacológicas) pueden medirse a lo largo del tiempo, tales como los niveles en plasma del fármaco, la reducción de glucosa y/o HbA1c aguda o crónica, niveles de insulina en 65 plasma, inhibición de consumo de alimentos, pérdida de peso y/o niveles de lípidos.

B. Dosificaciones eficaces

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento incluyen composiciones en las que el principio activo está contenido en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad eficaz para conseguir su fin pretendido. La cantidad real eficaz para una aplicación particular dependerá, entre otros, de la afección que se trate. Por ejemplo, cuando se administran en métodos para tratar la diabetes, dichas composiciones contendrán una cantidad de principio activo eficaz para conseguir el resultado deseado (por ejemplo, reducir la glucosa en sangre en ayunas en un sujeto). Cuando se administran en métodos para tratar la obesidad, dichas composiciones contendrán una cantidad de principio activo eficaz para conseguir el resultado deseado (por ejemplo reducir la masa corporal).

La dosificación y frecuencia (dosis individuales o múltiples) del compuesto administrado pueden variar dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo la vía de administración; talla, edad, sexo, salud, peso corporal, índice de masa corporal y dieta del receptor; la naturaleza y el alcance de los síntomas de la enfermedad que se trata (por ejemplo, la enfermedad sensible a compuestos descritos en el presente documento; glucosa en sangre en ayunas); presencia de otras enfermedades u otros problemas relacionados con la salud; tipo de tratamiento simultáneo; y complicaciones de cualquier enfermedad o régimen de tratamiento. Pueden usarse otros regímenes o agentes terapéuticos junto con los métodos y compuestos de la invención.

Las cantidades terapéuticamente eficaces para su uso en seres humanos pueden determinarse a partir de modelos animales. Por ejemplo, una dosis para seres humanos puede formularse para conseguir una concentración que se ha descubierto que es eficaz en animales. La dosificación en seres humanos puede ajustarse controlando uno o más parámetros fisiológicos, incluyendo pero sin limitación azúcar en sangre y masa corporal, y ajustando la dosificación hacia arriba o hacia abajo, como se ha descrito anteriormente y se conoce en la técnica.

Las dosificaciones pueden variarse dependiendo de los requisitos del paciente y el compuesto que se emplea. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para afectar a una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso. En general, el tratamiento se inicia con dosificaciones menores, que son menores que la dosis óptima del compuesto. A continuación, la dosificación se aumenta en incrementos pequeños hasta que se alcanza el efecto óptimo según las circunstancias. En una realización de la invención, el intervalo de dosificación es de 0,001 % al 10 % p/v. En otra realización, el intervalo de dosificación es de 0,1 % a 5 % p/v.

Sin embargo, las dosis típicas pueden contener desde un límite inferior de aproximadamente 1 µg, 5 µg, 10 µg, 50 µg, 100 µg a 150 µg por día hasta un límite superior de aproximadamente hasta 50 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg o incluso 300 µg del compuesto farmacéutico por semana a la vista de la semivida extendida de los polipéptidos modificados genéticamente del presente documento. Las dosis pueden suministrarse en dosis unitarias discretas en el intervalo deseado, por ejemplo, diariamente o semanalmente.

Las cantidades e intervalos de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles del compuesto administrado eficaces para la indicación clínica particular que se trate. Esto proporcionará un régimen terapéutico que es adecuado para la gravedad de la patología del individuo.

Utilizando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, se puede planear un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no provoque toxicidad sustancial y aun así sea completamente eficaz para tratar los síntomas clínicos demostrados por el paciente particular. Esta planificación debería implicar la selección cuidadosa del compuesto activo teniendo en cuenta factores tales como la potencia del compuesto, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la presencia y gravedad de efectos secundarios adversos, el modo preferido de administración y el perfil de toxicidad del agente seleccionado.

La propiedad de ahorro de dosis sorprendente de los polipéptidos modificados genéticamente de la presente invención, junto con su semivida en plasma sorprendentemente larga y duración de la acción farmacológica, proporciona un agente farmacéutico superior. También es sorprendente en el caso de los polipéptidos modificados genéticamente que contienen exendina su disponibilidad oral. Las propiedades superiores incluyen ahorro de dosis, lo que permite una dosificación menor, por lo tanto menos efectos secundarios o efectos secundarios menos graves y coste mejorado de los bienes, y/o formulaciones más rentables y sencillas para administración una vez al día o una vez a la semana que no se consigue actualmente por los compuestos parentales solamente.

C. Toxicidad

La relación entre la toxicidad y el efecto terapéutico para un compuesto particular es su índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre DL₅₀ (la cantidad de compuesto letal en el 50 % de la población) y DE₅₀ (la cantidad de compuesto eficaz en el 50 % de la población). Se prefieren compuestos que muestren altos índices terapéuticos. Pueden usarse datos de índices terapéuticos obtenidos de ensayos de cultivo celular y/o estudios animales en la formulación de una serie de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos

compuestos preferentemente queda dentro de un intervalo de concentraciones en plasma que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Véase, por ejemplo, *Fingl et al.*, En: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, C.1, p.1, 1975. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden seleccionarse por el médico individual a la vista de la condición del paciente y el método particular en que se use el compuesto.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que la fusión de un dominio de unión a albúmina ABD con un dominio hormonal como se describe en el presente documento, puede proporcionar inmunogenicidad reducida como se valora por una reducción en la respuesta inmunitaria en relación con el dominio hormonal sin fusión de ABD. Véase, por ejemplo, documento WO 2009/016043.

VII. Ejemplos

Los péptidos útiles en los ejemplos a continuación incluyen: HaPGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINK AKTVEGVEALKLHILAALP; HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKLAELAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 164); HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:165); HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSGGSLKNAKEDAI AELKKAGITSDFYFNAVNKAKTVEEVNALKNEILKALP (Compuesto 22) (SEC ID N°: 168); H(Aib)QGTFTSDYSKYLDEQAAKEFIAWLMN TYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 171); HSQGTFTSDYSKYLDEQAAKEFIAWLMNTYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 172); HSQGTFTSDYSKYLDEQAAKEFIAWLMNTGGGSYGVSD FYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 173); HaPGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSTGGGGASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINK AKTVEGVEALKLHILAALP (Compuesto 14), y [[Lys27#]HGETFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS][LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP-GGG-#] (Compuesto 30). Como es habitual en la técnica, una abreviatura de aminoácidos de una única letra en minúsculas (por ejemplo, "a") indica un D-aminoácido (por ejemplo, D-Ala). En la nomenclatura de compuestos peptídicos con enlaces de cadenas laterales, los corchetes ("[]") indican fragmentos separados y la almohadilla ("#") indica posiciones de enlace.

Ejemplo 1: Purificación de polipéptido modificado genéticamente con ABD-análogo de exendina.

Método. El Compuesto ejemplar 15 (SEC ID N°: 163) se produjo inicialmente con una extensión N terminal que incorpora un "marcador" His₆ (SEC ID N°: 49) como se conoce en la técnica, con la secuencia: MAHHHHHVGTGSNENLYFQHGETFTSDLSKQLEEEAVRLFIEW LKQGGPSKEIISTGGGGASLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEC ID N°: 50).

Preparación del extracto celular: Para preparar el extracto celular, se resuspendieron completamente sedimentos celulares de 50 ml de cultivos celulares en 60 ml de tampón de lisis (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0). Las células resuspendidas se procesaron a través de un microfluidificador (Microfluidics, MA) a 689,48 kPa tres veces. Los extractos celulares se centrifugaron durante 30 min a 16.000 x g para retirar los residuos. Se añadió EGTA (reserva 150 mM) al extracto celular hasta una concentración final de 3 mM.

Cromatografía Ni-NTA. Se empaquetaron diez ml de suspensión al 50 % de superflow Ni-NTA en una columna vacía de 15 ml. La columna se lavó con 10 ml de agua, 50 ml de tampón de lisis y 20 ml de tampón de lisis con EGTA 3 mM (TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0, EGTA 3 mM). Se añadió cuidadosamente extracto celular sobre la columna Ni-NTA, y se recogió el flujo continuo. La columna se lavó con 30 ml de tampón de lisis con EGTA ((TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0, EGTA 3 mM). Se añadieron diez ml de tampón de elución (TrisHCl 25 mM, NaCl 50 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0) a la parte superior de la columna, y se recogieron las fracciones de elución (2 ml/fracción). Se procesó SDS-PAGE para comprobar el flujo continuo y cada fracción. Se agruparon fracciones que contenían el compuesto marcado con His.

Digestión con TEV proteasa. Se diluyó el compuesto marcado con His₆ tres veces con TrisHCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0. Se añadió β-mercaptoetanol (0,1 %) y 2 % de Turbo TEV proteasa (2 mg/ml, 10.000 unidades/mg, Accelagen), y el resultado se mezcló y se incubó a TA durante 2 horas y a 4 °C durante una noche.

Retirada de marcador de His escindido y Turbo TEV con Ni-NTA. Se empaquetaron seis ml de suspensión al 50 % de superflow Ni-NTA en una columna vacía de 15 ml. La columna se lavó con 20 ml de agua y 20 ml de TrisHCl 50 mM, NaCl 100 mM, imidazol 45 mM, pH 8,0. La reacción de digestión de TEV se diluyó 2 veces con TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0. La reacción de digestión diluida se añadió cuidadosamente a la parte superior de la columna Ni-NTA y se recogió el flujo continuo. Se añadieron diez ml de (TrisHCl 50 mM, NaCl 100 mM, imidazol 45 mM, pH 8,0, a la columna para eluir cualquier proteína no unida. Los flujos continuos se recogieron y se combinaron.

Primera cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El flujo continuo de Ni-NTA se filtró con un filtro de 0,2 µm. Se pre-equilibró la columna Superdex 75 HiLoad 26/60 con 390 ml de PBS. Se inyectó el flujo continuo filtrado a la columna HiLoad 26/60 con una bomba de muestras. La proteína se eluyó con 1,5 VC de PBS, y se agrupó el pico de monómeros.

Segunda cromatografía de exclusión por tamaño. El primero grupo de SEC se filtró con un filtro de 0,2 µm. Se pre-equilibró una columna Superdex 75 HiLoad 26/60 con 390 ml de PBS. El flujo continuo filtrado se inyectó a la columna HiLoad 26/60 con una bomba de muestras. La proteína se eluyó con 1,5 VC de PBS, y se agrupó el pico de monómeros.

Tercera cromatografía de exclusión por tamaño. El segundo grupo de SEC se filtró con un filtro de 0,2 µm. Se pre-equilibró una columna Superdex 75 HiLoad 26/60 con 390 ml de PBS. El flujo continuo filtrado se inyectó a la columna HiLoad 26/60 con una bomba de muestras. La proteína se eluyó con 1,5 VC de PBS, y se agrupó el pico de monómeros.

Retirada de endotoxina residual con EndoTrap Red. El tercer grupo de SEC aún contenía ~20 UE/mg de endotoxina, que se retiró mediante el uso del EndoTrap Red. Brevemente, se activaron 0,5 ml de suspensión de gel añadiendo 1 ml de Tampón de Regeneración a la suspensión y se mezcló agitando suavemente el tubo durante aproximadamente 5 segundos. El sobrenadante se centrifugó y se aspiró. Esta etapa se repitió dos veces más. Se añadió un ml de Tampón de Equilibrado, y se realizó mezcla mediante agitación suave del tubo durante aproximadamente 5 segundos. El sobrenadante se centrifugó y se aspiró. Esta etapa se repitió dos veces más. Se añadió muestra de proteínas (5,5 ml) a la resina y se incubó durante 90 minutos a TA, con agitación o rotación suave del tubo mientras se incubaba. El resultado se centrifugó a 1200 x g durante 5 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio.

Resultados. La proteína purificada final migró en el gel SDS-PAGE como aproximadamente una proteína de 6 kD en las condiciones empleadas. El LC-MS mostró un peso molecular correcto de 9827 dalton. La producción de proteínas fue de 3,3 mg de 50 ml de cultivo celular.

Ejemplo 2: Actividades de polipéptidos modificados genéticamente con Exendina-ABD

Los polipéptidos modificados genéticamente con Exendina-ABD descritos en el presente documento conservaron suficiente actividad de exendina en un ensayo de activación celular *in Vitro*. Adicionalmente, los polipéptidos modificados genéticamente proporcionaron una duración de acción drásticamente mejorada para la reducción de glucosa en sangre y la pérdida de peso corporal, en comparación con exendina-4, cuando se administra como una única dosis a un mamífero. Sorprendentemente, la duración de acción puede extenderse hasta al menos 1 día, incluso al menos 4 días, e incluso al menos 7 días, o más, en un modelo de roedor, lo que se traduce a al menos una semana de duración de acción en un sujeto humano, por lo tanto, adecuado para administración dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana o incluso una vez a la semana.

La actividad funcional de los compuestos desvelados en el presente documento puede determinarse usando una línea celular que expresa un receptor de GLP-1. Véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos US20110097751A1 para el método de ensayo. En este ejemplo, la actividad funcional se determinó usando células que expresan de forma endógena GLP-1R, y la inducción de AMPc se detecta como una medida de la actividad de exendina. Se usó un kit de ensayo de HTRF (Cisbio International (Bedford, Mass.)). El bioensayo usó las células de carcinoma de tiroides de rata 6-23 (clon 6) en el ensayo basado en células usando el kit de 1.000 ensayos dinámico de AMPc 2 HTRF®, disponible de Cisbio con el n.º de Catálogo 62AM4PEB. Los patrones y calibraciones de HTRF® se preparan siguiendo las instrucciones en el kit. Se mide la acumulación de AMPc después de 30 minutos de tratamiento de compuesto usando el kit de ensayo de AMPc basado en células HTRF (CisBio) en un formato de 384 pocillos. La eficacia de los péptidos se determina en relación con el tratamiento celular con forskolina 10 µM (un activador constituido de la adenilato ciclasa), y la potencia (CE₅₀) de los péptidos se determina por el análisis de una curva de respuesta a concentración usando análisis de regresión no lineal ajustado a un modelo de 4-parámetros. Los resultados de la actividad funcional de receptor de GLP-1 (inducción de AMPc) para potencia (CE₅₀) se proporcionan en la siguiente Tabla 5, en la que los valores se normalizaron a un patrón de exendina-4. El dominio ABD no se unió a ni activó el receptor de GLP-1.

Tabla 5. Actividad funcional de GLP-1R

| Descripción | Actividad funcional de GLP-1R (CE ₅₀) en nM |
|--|---|
| Exendina-4 | 0,004 |
| [Leu ¹⁴ ,Gln ²⁸]Exendina-4(1-32)-fGLP-1(33-37) (SEC ID N°: 4) | 0,016 |
| Exendina-4 (1-28) amida | 0,011 |
| Compuesto 5 | 0,982 |
| Compuesto 6 | 0,0325 |
| Compuesto 15 | 0,091 |

| Descripción | Actividad funcional de GLP-1R (CE ₅₀) en nM |
|--------------|---|
| Compuesto 8 | 0,048 |
| Compuesto 10 | 0,146 |
| Compuesto 21 | 0,131 |
| Compuesto 31 | 0,62 |
| Compuesto 32 | 2,043 |
| Compuesto 33 | 0,77 |

Ejemplo 3: Actividad OGTT DOA

5 Los efectos en la glucosa en la sangre antes de la sonda de glucosa (1,5 k/kg de dextrosa) y a los 30 min después de la sonda de glucosa se investigaron 1 día después de la dosis del compuesto peptídico con diversas cantidades del Compuesto 15, con los resultados mostrados en las Figs. 1A-1B. El compuesto 31 a 25 nmol/kg también demostró actividad a las 24 horas después de la dosificación, como se muestra en la Figura 9. El fármaco se administró a ratones NIH/Swiss en ayunas durante 4 h a dosis indicadas en las figuras. Las barras representan la media \pm dt. El péptido se inyectó IP a t= -1 día. Sonda de glucosa (1,5 g/kg) proporcionada a t=0 a ratones hembra 10 NIB/Swiss en ayunas durante 4 horas. Se midió la glucosa en sangre con un OneTouch® Ultra® (LifeScan, Inc., a Johnson & Johnson Company, Milpitas, CA) * p<0,05 frente a control de vehículo; ANOVA, ensayo de Dunnett. Esta OGTT DOA indica que la actividad farmacológica está presente al menos 24 horas después de administrarse el fármaco. La exendina-4 (no conjugada) fue ineficaz en este ensayo cuando se dosificó a t-24 horas (1 día antes del ensayo de glucosa) e incluso a dosis mayores.

Ejemplo 4: Actividad OGTT DOA

20 Los efectos en la glucosa en la sangre antes de la sonda de glucosa (1,5 k/kg de dextrosa) y a los 30 min se investigaron 2 días después de la dosis con diversas cantidades del Compuesto 15, con los resultados mostrados en las Figs. 2A-2B. Se administró fármaco a ratones NIH/Swiss en ayunas durante 4 h a las dosis indicadas en las figuras. Esta OGTT DOA indica que la actividad farmacológica está presente al menos 48 horas después de administrarse el fármaco.

Ejemplo 5: Actividad OGTT DOA

25 Se realizó una comparación de los efectos de los Compuestos 15 y 8 en la glucosa en sangre, con los resultados representados en las Figs. 3A-3B. Se administró fármaco a ratones NIH/Swiss en ayunas durante 4 h a las dosis indicadas en las figuras. Esta OGTT DOA indica que la actividad farmacológica está presente al menos 24 horas después de administrarse el fármaco.

Ejemplo 6: Efecto del Compuesto 15 en ratas anestesiadas alimentadas con HSD

35 Los efectos del tratamiento con el Compuesto 15 (240 nmol/kg) se investigaron en ratas anestesiadas alimentadas Sprague Dawley 5 días después de la dosis. El ciclo temporal de la glucosa en plasma después de IVGTT se representa en la Fig. 4A. Se representan los niveles de glucosa integrados (ABC₀₋₆₀) en el histograma de la Fig. 4B. El ciclo temporal del cambio en los niveles de insulina en los sujetos de ensayo se representó en la Fig. 4C. Los niveles de insulina integrados (ABC₀₋₃₀) se representan en la Fig. 4E. El ciclo temporal del cambio de peso corporal (% de cambio desde la línea basal) se representa para los sujetos de ensayo en la Fig. 4E. Se proporciona una representación de histograma del consumo de alimentos diario para los sujetos de ensayo en la Fig. 4F. Esta IVGTT 40 DOA indica que la actividad farmacológica está presente al menos 5 días horas después de administrarse el fármaco, particularmente para efectos en el peso corporal y el consumo de alimento diario.

Ejemplo 7: Efecto del Compuesto 15 en ratones *ob/ob*

45 El ciclo temporal del efecto del Compuesto 15 en el peso corporal, la glucosa y HbA_{1c} en ratones *ob/ob* se investigó después de la dosis. Como se representa en la Fig. 5A, una pérdida de peso corporal significativa acompaña al tratamiento con Compuesto 15 250 nmol/kg. Los cambios en la glucosa (% pre-tratamiento) y en HbA_{1c} (% pre-tratamiento) se representa en las Figs. 5B-5C. Los puntos representan la media \pm d.t. (desviación típica). Se inyectó Compuesto 15 sc el día=0 inmediatamente después de la recogida de muestras de línea basal en ratones *ob/ob* 50 macho sin ayunas. A no ser que se indique de otro modo, las medidas de glucosa en sangre descritas en el presente documento emplearon un dispositivo OneTouch® Ultra® (LifeScan, Inc. Milpitas, CA). El Compuesto 21 también demostró pérdida de peso corporal y reducción de HbA_{1c}.

Ejemplo 8: Actividad del Compuesto 15 en ratas Grasas Diabéticas de Zucker (ZDF)

55 Para evaluar la eficacia de reducción de peso corporal y glucosa combinadas de compuestos ejemplares descritos en el presente documento, se investigaron los efectos dependientes de dosis del Compuesto 15 en ratas ZDF

macho de ~ 14 semanas de edad. La glucosa de línea basal fue de 426 mg/dl, y el peso corporal de línea basal fue de 431 g. Tamaño de grupo n=8. La Fig. 6A representa el ciclo temporal del cambio en el peso corporal (% corregido por vehículo) después del tratamiento. La Fig. 6B representa el ciclo temporal de glucosa en plasma.

5 Ejemplo 9: Actividad de los Compuesto 15, 8 y 10 en OGTT DOA (Duración de Acción)

Se investigaron los efectos de los compuestos 15, 8 y 10 en el cambio en la glucosa en sangre a los 30 min (% pre-sonda), como se representa en la Fig. 7. En la figura, las barras representan media \pm d.t. Se inyectó compuesto de ensayo IP a t= -1 día. Sonda de glucosa (1,5 g/kg) proporcionada a t=0 a ratones hembra NIH/Swiss en ayunas durante 4 h. Se midió la glucosa en sangre como se describe en el presente documento. Esta OGTT DOA indica que la actividad farmacológica está presente al menos 24 horas después de administrarse el fármaco.

Ejemplo 10: Actividad de los Compuestos en la DOA (Duración de Acción) de OGTT a las 24 horas

15 Los efectos de los compuestos desvelados en el presente documento en el cambio en la glucosa en sangre a los 30 min (% pre-sonda) se investigaron como se ha descrito anteriormente. Se inyectó compuesto de ensayo IP a t= -1 día a 25 nmol/kg. Sonda de glucosa (1,5 g/kg) proporcionada a t=0 a ratones hembra NIH/Swiss en ayunas durante 4 h. Se midió la glucosa en sangre como se describe en el presente documento. Esta OGTT DOA indica que la actividad farmacológica está presente al menos 24 horas después de administrarse el fármaco. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 6. El Compuesto 30 (con enlace de lisina 27) y el Compuesto 32 no proporcionaron reducción de glucosa, lo que indica una falta de presencia a las 24 horas en estas condiciones. La exendina-4 (no conjugada) fue ineficaz en este ensayo cuando se dosificó a t-24 horas, e incluso a dosis mayores. El Compuesto 14 con prolina en la posición 3 estaba esencialmente inactivo en el ensayo funcional *in vitro* e inactivo (y quizás promoviendo el peso) en el ensayo de OGTT de reducción de glucosa (datos no mostrados). El Compuesto 22 con una secuencia de unión a albúmina de la proteína PAB de *P. Magnus* tuvo poca reducción de peso (3 %) si la tuvo en el ensayo anterior. El Compuesto 19 y el Compuesto 20 con ABD truncados aún mantuvieron una actividad *in vitro*, pero con duración reducida, teniendo una reducción de glucosa del 6 % y 8 % en los ensayos de OGTT DOA, respectivamente.

30 Tabla 6. Reducción de glucosa en OGTT a las 24 horas después de la dosis

| Descripción | % de reducción de glucosa en comparación con vehículo |
|--------------|---|
| Compuesto 5 | -28 |
| Compuesto 6 | -18 |
| Compuesto 15 | -21 |
| Compuesto 8 | -21 |
| Compuesto 10 | -22 |
| Compuesto 21 | -23 |
| Compuesto 23 | -23 |
| Compuesto 24 | -17 |
| Compuesto 31 | -22 |
| Compuesto 33 | -19 |

Ejemplo 11: Unión a albúmina en suero

35 Puede realizarse caracterización de la unión de compuestos polipeptídicos modificados genéticamente con albúmina por cualquiera de varios métodos, incluyendo el de Biacore descrito en el presente documento. En este ejemplo se realizaron mediciones de unión con un sistema BioRad ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, Estados Unidos; Sistema de Matrices de Interacción Proteica ProteOn XPR36 número de catálogo n.º 176-0100), usando una microplaca sensora GLC a 25 grados C. Para acoplamiento de amina la microplaca de GLC se activó durante 5 minutos usando una mezcla 1:1 de sulfo-NHS/EDC diluida 30 veces desde la reserva inicial en agua como se muestra posteriormente. Cada muestra de albúmina se diluyó a 25 μ g/ml en Na acetato 10 mM pH 5,0 y se inyectó durante 5 minutos sobre superficies sensoras separadas. Cada superficie se bloqueó después con etanolamina 1 M pH 8,5. Cada albúmina se acopló a una densidad de 2000-5000 en unidades de resonancia. La unión de un polipéptido modificado genéticamente se ensayó usando 5 nM como la mayor concentración en una serie de diluciones triples. El tampón de ejecución contenía HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tween-20 0,005 %. Todas las muestras se ensayaron usando una serie de diluciones triples. Cada serie de concentraciones se ensayó por duplicado. La fase de disociación para la mayor concentración se controló durante 3 horas.

50 La K_D relativa medida para los polipéptidos modificados genéticamente se presenta en la Tabla 7 posterior. Los resultados muestran que los polipéptidos de unión a albúmina se asocian con albúminas de suero con alta afinidad. El número entre paréntesis representa la desviación típica en el último dígito significativo. Como se ve a partir de la siguiente tabla los polipéptidos de exendina fusionados con dominios de unión a albúmina de SEC ID N°: 35

conservan afinidad extremadamente alta para albúmina de suero de diversas especies, especialmente albúmina de suero humano, incluso en comparación con el péptido ABD no conjugado en sí mismo.

Tabla 7

| Compuesto | AS Humana | AS de Perro | AS de Mono | AS de Ratón | AS de Rata |
|---------------|-----------|-------------|------------|-------------|------------|
| SEC ID N°: 35 | 16 (4)pM | 201(2)pM | 123(1)pM | 1,24(1)nM | 18 (5)pM |
| Compuesto 15 | 68 pM | 513 pM | 91 pM | 1,25 nM | 200 pM |
| Compuesto 21 | 85 pM | 397 pM | 78 pM | 1,33 nM | 16 pM |

5

Ejemplo 12. Actividad en presencia de albúmina de suero

Se demostró la caracterización de la actividad *in vitro* de los compuestos polipeptídicos modificados genéticamente en presencia de albúmina de suero. Los ensayos pueden realizarse en presencia y ausencia de una albúmina, particularmente albúmina de suero humano. Los datos anteriores se determinaron en presencia de albúmina de suero bovino (BSA) aproximadamente 0,1 %. La siguiente tabla presenta la actividad funcional del ensayo de activación de receptor (inducción de AMPc) descrito anteriormente, pero en presencia de albúmina de suero de diversas especies. Como puede verse, sorprendentemente, incluso cuando los compuestos están unidos con albúmina de suero, tal como con albúmina de suero humano, a pesar de la presencia de la albúmina en suero grande, con su potencial para impedimento estérico e incluso un cambio en el radio de Stoke aparente de los compuestos resultantes de unión a albúmina, el polipéptido modificado genéticamente conserva actividad agonista del receptor de GLP-1. Dada la afinidad picomolar de ABD y los polipéptidos modificados genéticamente con algunas especies de albúmina en suero, por ejemplo albúmina de suero humano, se cree que el polipéptido modificado genéticamente se une completamente de forma eficaz con albúmina presente en el ensayo (y por lo tanto también *in vivo* en sangre en circulación). Debido a la afinidad extremadamente alta de la unión de compuestos con albúmina (como anteriormente) y la presencia de alta concentración de albúmina de suero en la sangre, se espera que los compuestos existan esencialmente en el estado unido *in vivo* pero sorprendentemente proporcione suficientes funciones de exendina (como se demuestra en el presente documento).

25

Tabla 8

| Compuesto | Albúmina bovina 0,1 % | Albúmina bovina 1 % | Albúmina humana 1 % | Albúmina de rata 1 % |
|---|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| GLP-1(7-36) amida | 0,0306 | 0,0058 | 0,0112 | 0,0179 |
| Compuesto 15 | 0,7854 | 0,2204 | 0,185 | 0,2473 |
| Compuesto 21 | 1,1013 | 0,2234 | 0,2022 | 0,2164 |
| Compuesto 31 | 1,1408 | 0,2313 | 0,2139 | 0,2358 |
| GLP-1(7-36) amida en condiciones de ensayo normales | 0,0256 | 0,0224 | 0,0165 | 0,0153 |

Ejemplo 13. Los compuestos son estables frente a plasma humano y enzimas de plasma humano

Los compuestos se examinaron con respecto a su estabilidad frente a plasma humano y proteasas de membrana celular humana. La estabilidad de péptidos representativos en plasma humano se realizó de la siguiente manera. Se prepararon 10 µg/ml de compuesto en plasma humano a suficiente volumen para retirar muestras de 100 µl cada 10 minutos durante el periodo de tiempo (5 horas), comenzando en el punto temporal cero. Después de la adición del compuesto al plasma humano, la mezcla se mezcla suavemente y se transfiere una muestra de 100 µl de la mezcla a un tubo de microcentrifuga para representar el punto temporal cero. El resto de la muestra se colocó en un incubador a 37 grados C, mezclando a 600 RPM durante sesenta minutos. A intervalos de 10 minutos, se retiró una muestra de 100 µl de la mezcla y se transfirió a tubos de microcentrifuga separados. Después de la transferencia de la muestra de 100 µl en el punto temporal cero y cada intervalo de 10 minutos, cada muestra recogida se extrajo por adición lenta de 100 µl de ácido fórmico: acetonitrilo 0,2 % frío, mezclando al mismo tiempo. Después de la adición de la solución de acetonitrilo, la muestra se mezcló en vórtex a alta velocidad durante 15 segundos. Las muestras extraídas se almacenaron a -20 °C, durante al menos 20 minutos y después se centrifugaron a 11.000xg durante 10 minutos a 5 grados C. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga, se centrifugó de nuevo, y finalmente se transfirió para análisis de LC/MS. Se realizó análisis de muestras en un HPLC Agilent (LC/MS 1200) usando un gradiente de acetonitrilo de 5-95 % en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %. La Tabla 9 presenta resultados normalizados con respecto a un patrón (100 %). La Figura 8 presenta un perfil temporal del porcentaje de compuesto restante en Plasma Humano durante el ciclo temporal de 5 horas.

45

Tabla 9.

| Compuesto | Porcentaje Estable en Plasma Humano |
|--|-------------------------------------|
| GLP-1(7-37) amida (SEC ID N°: 5) | 41,7 |
| HGEGTFTSDLKQLEEEAVRLFIEWLQGGPSKEIIS (SEC ID N°: 4) | 100 |
| Compuesto 15 | 96,0 |
| Compuesto 21 | 89,5 |
| Compuesto 31 | 93,7 |

Se realizó un ensayo de estabilidad relativa de péptidos representativos en una membrana de borde en cepillo de riñón humano (KBBM) de la siguiente manera. Los extractos proteicos de membranas de borde en cepillo de riñón humano son ricos en diversas peptidasas. Se eluyó preparación de extracto de proteínas (hKBBMP), 5 microl (aproximadamente 7 microgramos/ml de proteína) con 625 microl de tampón HEPES (25 mM, pH 7,4) en un tubo de microcentrífuga de polipropileno con un sello de junta tórica para evitar la evaporación del disolvente. En un vial separado, se preparó una solución de reserva de péptido (300 microM en acetonitrilo al 50 % en agua) y se añadieron 70 microl de esta solución a la solución de hKBBMP anterior. La solución se mezcló suavemente por agitación manual de modo que la concentración peptídica final es de 30 microM. Después se separaron en alícuotas 100 microl de esta solución en seis tubos diferentes y en un tubo se añadieron 200 microl de la solución de detención enzimática (acetonitrilo al 50 % en agua con TFA al 0,1 %). Este tubo se usó para la medición de la concentración de péptido inicial en tiempo t=0 minutos mientras que los otros 5 tubos se incubaron a 37 grados C usando un baño de agua. A intervalos de 1, 2, 3, 4 y 5 horas, cada tubo se sacó y se inactivó con 200 microl de solución de detención. Finalmente, los seis tubos se centrifugaron a 1.800 x g durante 10 min para retirar cualquier proteína precipitada. El sobrenadante (10 microl) se transfirió a un automuestreador de HPLC, y usando el método de recuento de iones seleccionados se midió la ABC. Cada muestra se procesó por triplicado y se calculó el ABC promedio para análisis de datos. Se realizó análisis de muestras en HPLC Agilent con detector de masas con un acetonitrilo con gradiente de TFA 0,1 %. El porcentaje de péptido parental restante desde tiempo t=0 a 5 horas de digestión enzimática se representó usando software GraphPad Prism® 5. Los datos se presentaron como estabilidad peptídica relativa frente a control positivo para cada péptido. Como se ha observado las muestras se procesaron como n = 6, y el VC estaba dentro del 20 %. Los resultados del ensayo de estabilidad de hKBBM se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10

| Compuesto | Porcentaje Estable |
|--|--------------------|
| GLP-1(7-37) amida (SEC ID N°: 5) | 16 |
| HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS (SEC ID N°: 4) | 100 |
| Compuesto 21 | 103 |

Ejemplo 14. Falta de Vacuolización

Con algunos fármacos, tales como proteínas pegiladas, pueden formarse vacuolas no deseables en citoplasma de células epiteliales que revisten los túbulos convolucionados proximales, lo que es una medida de toxicidad indeseable. Los compuestos de unión a albúmina modificados genéticamente de la presente solicitud no forman vacuolas de riñón. Se pesaron ratones hembra C57BL6 (n=2 jaulas, 3 ratones/jaula) diariamente 3 horas antes de apagar las luces. Inmediatamente después de pesarlos, los días 0-6 se inyectó a los ratones por vía subcutánea el compuesto de ensayo. Los ratones se sacrificaron el día 7 después de enviarse los riñones para histopatología. La puntuación de gravedad para vacuolación citoplasmática de células epiteliales tubulares corticales renales fue la siguiente: puntuación 1 = mínima (8-15 %); 2 = leve (16-35 %); 3 = moderada (36-60 %); 4 = notable (>60 %). Un compuesto de control positivo que se sabía que provocaba formación de vacuolas se puntuó como 3. El polipéptido de ABD en sí mismo tuvo una puntuación de 0. El Compuesto 15 tuvo una puntuación de 0.

Ejemplo 15. Efecto en la inhibición del consumo de alimentos en ratones normales

Se determinó el ciclo temporal del efecto de los compuestos de ensayo en la inhibición del consumo de alimentos de ratones normales. Como se representa en la Fig. 10A, una pérdida de peso corporal significativa, dependiente de la dosis, acompaña el tratamiento con el Compuesto 31 durante 6 horas. La Figura 10B demuestra una inhibición sostenida, dependiente de la dosis, del consumo de alimentos después de una única dosis de compuesto, durante al menos 54 horas en ratones normales. El efecto del análogo de exendina desaparece a las 24 horas. El Compuesto 31 aún inhibe significativamente el consumo de alimentos incluso a los 3 días a la mayor dosis. Los puntos representan la media \pm dt de n=4 jaulas (3 ratones/jaula). El péptido se inyectó IP a t=0. Se introdujo alimento inmediatamente después de la inyección y la cantidad consumida se midió a t=30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min, 24 h, 30 h, 48 h y 54 h. *p<0,05 frente a control de vehículo; ANOVA, ensayo de Dunnett. Las DE₅₀ fueron ~10 nmol/kg para el Compuesto 31 y 2 nmol/kg para [Leu14] exendina-4.

Ejemplo 16: Efecto de un polipéptido de dominio a unión a albúmina-exendina en ratones ob/ob diabéticos

Para demostrar el efecto de la exposición crónica de un polipéptido modificado genéticamente con dominio de unión a albúmina-exendina descrito en el presente documento en la reducción de glucosa, reducción HbA_{1c} y reducción de peso corporal, se trataron ratones ob/ob diabéticos con el Compuesto 15 y el Compuesto 21. El ciclo temporal del efecto del compuesto de ensayo en el peso corporal, reducción de la glucosa y reducción de HbA_{1c} en ratones ob/ob se investigó después de la dosis, con los valores a las 4 semanas presentados en las Figuras 11A, 11B, 11C y 11D. Las Figuras 11A (Compuesto 15) y 11B (Compuesto 21) representan cambios en la glucosa en sangre en comparación con liraglutida, todos proporcionados dos veces por semana (BIW) y la Figura 11C representa la reducción de HbA_{1c} (% de cambio desde la línea basal) para el Compuesto 15 y el Compuesto 21 proporcionados dos veces por semana (BIW), en comparación con la exendina-4 proporcionada por infusión subcutánea continua

(CSI). La Figura 11D representa la reducción del peso corporal (% de cambio desde la línea basal) para el Compuesto 15 y el Compuesto 21 proporcionados dos veces por semana (BIW), en comparación con la exendina-4 proporcionada por infusión subcutánea continua (CSI). Sorprendentemente, como se ve a partir de las Figuras 11A y 11B, cada compuesto es superior a liraglutida a dosificación equimolar para reducción de glucosa tras la exposición crónica. Además, a dosificación equimolar a liraglutida, el Compuesto 15 y el Compuesto 21 fueron cada uno más eficaces que liraglutida [N-épsilon-(gamma-Glu(N-alfa-hexadecanoil)-Lys26, Arg34)-GLP-1-(7-37)-ácido, un derivado de GPL-1 de unión a albúmina de acción larga, en la reducción de HbA1c y pérdida de peso corporal (datos no mostrados). Como se representa en la Fig. 11C una reducción de HbA1c significativa acompaña el tratamiento y en la Fig. 11D una pérdida de peso corporal significativa acompaña al tratamiento, con 25 y 250 nmol/kg de cada compuesto proporcionados por vía intraperitoneal (IP) dos veces cada semana durante 28 días. Los puntos representan la media \pm d.t. (desviación típica). Cada compuesto de ensayo se inyectó ip el día=0 inmediatamente después de la recogida de muestras de línea basal en ratones *ob/ob* macho sin ayunas. Los efectos observados para la dosis biw (dos veces por semana) 25 nmol/kg fue mayor que la observada para exendina-4 proporcionada a $-7,2$ nmol/kg/d por infusión continua (CSI), una dosis que se sabe que proporciona una eficacia máxima para exendina-4. Por lo tanto a una dosis equimolar comparable, el Compuesto 15 y el Compuesto 21 excedieron los efectos de pérdida de peso corporal y glucémicos de la dosis de máxima eficacia de exendina-4. A 250 nmol/kg, el Compuesto 15 era significativamente mayor y el Compuesto 21 era dos veces más eficaz, que la dosis de máxima eficacia de exendina-4. A no ser que se indique de otro modo, las medidas de glucosa en sangre descritas en el presente documento emplearon un dispositivo OneTouch® Ultra®(LifeScan, Inc. Milipitas, CA).

Sorprendentemente, a pesar de la reducida potencia *in vitro* en comparación con exendina-4 no conjugada como se ha observado anteriormente, la actividad *in vivo* aguda (en un periodo de 6 horas) de una exendina fusionada con un polipéptido de unión a albúmina desvelado en el presente documento es similar a la de exendina no conjugada con respecto a eficacia máxima y solamente ligeramente menor (varias veces) con respecto a la potencia (DE50 por ejemplo), tal como cuando se mide por reducción del consumo de alimentos en ratones (datos no mostrados). Aún más sorprendentemente, el efecto de la exposición crónica demuestra que una exendina fusionada con los polipéptidos de unión a albúmina desvelados en el presente documento es tan potente o tiene incluso mayor potencia que la exendina-4 (infundida de forma continua) pero es capaz de proporcionar un efecto máximo mayor. Además, a la luz de la afinidad muy alta por albúmina de ratón o de rata y velocidades de disociación bajas, todos los compuestos modificados genéticamente se unen eficazmente con albúmina en los ensayos *in vivos* (así como en los ensayos *in vitro*). Por lo tanto, los polipéptidos modificados genéticamente conservaron la actividad funcional de GLP-1R incluso cuando se unieron con albúmina. Esto es sorprendente en parte porque se ha indicado que los compuestos de albúmina, por ejemplo liraglutida, están significativamente activos solamente cuando se disocian de albúmina. Además otros han indicado la necesidad de retirar proteolíticamente una exendina de un péptido de unión a albúmina con el que se conjugó para obtener una función de exendina. En consecuencia, las actividades *in vivo* como se muestra en el presente documento son aún más impresionantes.

Ejemplo 17: Duración y acción larga de los polipéptidos modificados genéticamente *in vivo*

Para demostrar adicionalmente la semivida larga y duración de actividad larga de los polipéptidos modificados genéticamente descritos en el presente documento, las propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD) se determinaron usando ratas. Se presenta el perfil farmacocinético y la actividad biológica de los polipéptidos modificados genéticamente ejemplares Compuesto 15 y Compuesto 21 dosificados por vía subcutánea en ratas Harlan Sprague-Dawley (HSD) normales. Los compuestos modificados genéticamente recombinantes Compuesto 21 y Compuesto 15 se inyectaron por vía subcutánea a $t=0$ a 25 nmol/kg en ratas HSD normales. Se recogió sangre mediante sangrado de la cola a $t=1$ hora, 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas y 168 horas de ratas macho HSD alimentadas. Se midieron diariamente los pesos del alimento y corporales. La Figura 12A representa el efecto del Compuesto 15 y el Compuesto 21 para reducir el consumo de alimentos. La Figura 12B representa el efecto del Compuesto 15 y el Compuesto 21 para reducir el peso corporal. La Figura 12C representa un perfil PK del Compuesto 15 y el Compuesto 21 después de una única dosis. Los puntos representan la media \pm dt.

Se observó exposición de al menos hasta siete (7) días para ambos polipéptidos modificados genéticamente ejemplares. El Compuesto 15 tiene una semivida aparente de 54 horas y el Compuesto 21 tiene una semivida aparente de 61 horas, en ratas por este suministro subcutáneo. Por cambio de escala alométrico y a la vista de la fuerte afinidad de los polipéptidos modificados genéticamente por la albúmina humana, se espera duración de la actividad física y biológica al menos tan larga e incluso más larga en sujetos humanos. En consecuencia, los compuestos tienen uso para administración al menos dos veces al día (por ejemplo mañana y noche), al menos diariamente, dos veces a la semana e incluso una vez a la semana, especialmente en sujetos humanos.

Se presenta el perfil farmacocinético y la actividad biológica de un polipéptido modificado genéticamente ejemplar dosificado por vía intravenosa en ratas Harlan Sprague-Dawley (HSD) normales. El compuesto modificado genéticamente recombinante Compuesto 31 se inyectó por vía intravenosa a $t = 0$ a 2 nmol/kg en ratas HSD normales. Se recogió sangre mediante sangrado de la vena de la cola a $t = 1$ hora, 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas y 168 horas de ratas macho HSD alimentadas. Se recogió sangre mediante sangrado de la cola a $t = 1$ hora, 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas y 168 horas de ratas macho HSD

alimentadas. Se midieron los pesos del alimento y corporales diariamente. La figura 13A representa el efecto del Compuesto 31 para reducir el consumo de alimentos. La figura 13B representa el efecto del Compuesto 31 para reducir el peso corporal. La figura 13C representa un perfil PK del Compuesto 31 después de una única dosis IV. La semivida se estima en aproximadamente al menos 14 horas, los puntos representan la media \pm dt.

5 Se observó exposición de hasta siete (7) días para este polipéptido modificado genéticamente ejemplar, incluso a estas dosis relativamente bajas. Por cambio de escala alométrico y a la vista de la fuerte afinidad de los polipéptidos modificados genéticamente por la albúmina humana, se espera duración de la actividad física y biológica al menos tan larga e incluso más larga en sujetos humanos. En consecuencia, los compuestos tienen uso para administración al menos dos veces al día (por ejemplo mañana y noche), al menos diariamente, dos veces a la semana e incluso una vez a la semana, especialmente en sujetos humanos.

Ejemplo 18: El suministro oral de polipéptidos modificados genéticamente consigue distribución sistémica

15 Se investigó el suministro oral con captación intestinal usando un compuesto modificado genéticamente representativo. Se dosificaron a ratones diabéticos db/db por vía oral (peroral mediante sonda) 240 nmol/kg de los siguientes compuestos, un análogo de exendina ácido de [Leu14,Gln28]Exendina-4-(1-32)-fGLP-1-(33-37) y Compuesto 15. Los datos demuestran que los péptidos modificados genéticamente están biodisponibles por vía oral, incluso en una formulación PBS/propilenglicol (50:50) sin otros excipientes específicos que podrían potenciar el suministro y la captación. En comparación con el análogo de exendina, el Compuesto 15 (ambos a una dosis de 1 mg/kg) a más de dos veces el peso molecular del análogo de exendina también está biodisponible por vía oral en la misma formulación. Los resultados indican que ambos compuestos estaban activos cuando se dosificaron por vía oral, y eran igualmente eficaces en las condiciones ensayadas hasta 120 minutos. Los resultados se presentan en la Figura 14. Los puntos representan la media \pm dt. Se dosificaron péptidos por vía peroral por sonda a t = 0 inmediatamente después de la toma de una muestra de línea basal. Los ratones fueron ratones db/db en ayunas durante 2 horas. En consecuencia, los compuestos presentados en el presente documento tienen uso para administración oral al menos dos veces al día (por ejemplo mañana y noche), al menos diariamente, tres veces a la semana, dos veces a la semana e incluso una vez a la semana, especialmente en sujetos humanos.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amylin Pharmaceuticals, Inc.
Erickson, Mary
Litzinger, David C.
35 Ghosh, Soumitra S.
Guo, Zijian

<120> Polipéptidos Modificados Genéticamente Que Tienen Duración De Acción Potenciada

40 <130> 92494-819793

<150> US 61/387.391
<151> 28-09-2010

45 <150> US 61/422.085
<151> 10-12-2010

<160> 212

50 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 39
<212> PRT

55 <213> *Heloderma horridum*

<400> 1

ES 2 563 091 T3

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

5 <213> *Heloderma suspectum*

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 3

10 <211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido sintético

<400> 3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 4

20 <211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido sintético

<400> 4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser
35

ES 2 563 091 T3

<210> 5
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

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> 6
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> *Rattus Norvegicus*

10

<400> 6

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30
 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

15

<210> 7
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 7

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
 20 25 30
 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

25

<210> 8
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 8

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30
 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

ES 2 563 091 T3

000
 <210> 15
 5 <400> 15
 000
 <210> 16
 10 <400> 16
 000
 <210> 17
 15 <400> 17
 000
 <210> 18
 20 <400> 18
 000
 <210> 19
 25 <400> 19
 000
 <210> 20
 30 <400> 20
 000
 <210> 21
 35 <400> 21
 000
 <210> 22
 40 <400> 22
 000
 <210> 23
 <211> 46
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 50 <400> 23
 Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15
 Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30
 Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45
 <210> 24
 <211> 46
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 563 091 T3

<223> Polipéptido sintético

<400> 24

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val His Thr Leu Ile Gly His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

5 <210> 25
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 25

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Asn Ala Leu Thr His His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

15 <210> 26
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 26

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Arg Ala Arg Thr Val Glu
20 25 30

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

25 <210> 27
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 27

ES 2 563 091 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

5 <210> 28
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 28

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Ser Ser Leu Lys Gly His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

15 <210> 29
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 29

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Thr Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

25 <210> 30
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 30

ES 2 563 091 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

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

<210> 31
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polipéptido sintético

10

<400> 31

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Ser Leu Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Asp Ala Leu Thr Ser His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 32
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Polipéptido sintético

20

<400> 32

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Asn Ser Leu Thr Ser His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 33
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Polipéptido sintético

30

<400> 33

ES 2 563 091 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Asn Val Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

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

<210> 34
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 34

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Gln Ala Leu Ile Ala His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 35
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 35

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 36
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 36

ES 2 563 091 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 37

5 <400> 37
 000

<210> 38

10 <400> 38
 000

<210> 39

15 <400> 39
 000

<210> 40

20 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido sintético

<400> 40

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
 35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 50 55 60

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
 65 70 75 80

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85 90

<210> 41

30 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Polipéptido sintético

<400> 41

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys
50 55 60

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr
65 70 75 80

Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu
85 90 95

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
100 105

<210> 42
<211> 91
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polipéptido sintético

10

<400> 42

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Leu Ala Glu
35 40 45

Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp
50 55 60

Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu
65 70 75 80

Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 43
<211> 103
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Polipéptido sintético

20

<400> 43

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu
50 55 60

Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg
65 70 75 80

Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu
85 90 95

His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
100

<210> 44

5 <400> 44
000

<210> 45

10 <400> 45
000

<210> 46

15 <400> 46
000

<210> 47

20 <400> 47
000

<210> 48

25 <400> 48
000

<210> 49

30 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

35 <400> 49

His His His His His His
1 5

<210> 50

<211> 111

<212> PRT

ES 2 563 091 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 50

```

Met Ala His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
 1          5          10          15

Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
          20          25          30

Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln
          35          40          45

Gly Gly Pro Ser Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Ser Ala
 50          55          60

Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr
 65          70          75          80

Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
          85          90          95

Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
          100          105          110
    
```

<210> 51

<211> 82

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 51

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1          5          10          15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
          20          25          30

Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
          35          40          45

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala
 50          55          60

Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 65          70          75          80

Leu Pro
    
```

<210> 52

<211> 82

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Polipéptido sintético

ES 2 563 091 T3

<400> 52

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 35 40 45

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala
 50 55 60

Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 65 70 75 80

Leu Pro

<210> 53

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 53

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
 35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 50 55 60

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 65 70 75 80

Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85 90

<210> 54

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 54

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
50 55 60

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
65 70 75 80

Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 55

<211> 93

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 55

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
65 70 75 80

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 56

<211> 105

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <400> 56

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys
 50 55 60

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr
 65 70 75 80

Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu
 85 90 95

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100 105

<210> 57
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 57

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu
 35 40 45

Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp
 50 55 60

Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu
 65 70 75 80

Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85 90

<210> 58
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido sintético

ES 2 563 091 T3

<400> 58

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 35 40 45
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu
 50 55 60
 Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg
 65 70 75 80
 Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu
 85 90 95
 His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100

<210> 59

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 59

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 50 55 60
 Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala
 65 70 75 80
 Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 85 90 95
 Leu Pro

<210> 60

<211> 109

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 563 091 T3

<223> Polipéptido sintético

<400> 60

5

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1           5           10           15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
           20           25           30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Thr Gly Gly Gly
           35           40           45

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
           50           55           60

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
65           70           75           80

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
           85           90           95

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
           100          105
    
```

10

<210> 61
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 61

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1           5           10           15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
           20           25           30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
           35           40           45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
           50           55           60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65           70           75           80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
           85
    
```

20

<210> 62

ES 2 563 091 T3

<211> 94
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 62

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1                               5                               10          15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
                20                               25                               30

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
                35                               40                               45

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
                50                               55                               60

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
65                               70                               75                               80

Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
                85                               90
    
```

10 <210> 63
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 63

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1                               5                               10          15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
                20                               25                               30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
                35                               40                               45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
                50                               55                               60

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
65                               70                               75                               80

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
                85                               90
    
```

20 <210> 64
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>

ES 2 563 091 T3

<223> Polipéptido sintético
<400> 64

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1                               5                               10                               15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
                20                               25                               30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                35                               40                               45

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys
 50                               55                               60

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
 65                               70                               75                               80

Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu
                85                               90                               95

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
                100                               105
    
```

5 <210> 65
<211> 91
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido sintético

```

<400> 65
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1                               5                               10                               15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
                20                               25                               30

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu
 35                               40                               45

Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp
 50                               55                               60

Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg
 65                               70                               75                               80

Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
                85                               90
    
```

15 <210> 66
<211> 103
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido sintético

ES 2 563 091 T3

<400> 66

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1                               5                               10                               15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
                20                               25                               30

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
                35                               40                               45

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu
 50                               55                               60

Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn
65                               70                               75                               80

Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu
                85                               90                               95

His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
                100
    
```

<210> 67

5 <211> 82

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 67

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1                               5                               10                               15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
                20                               25                               30

Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
                35                               40                               45

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala
50                               55                               60

Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
65                               70                               75                               80

Leu Pro
    
```

<210> 68

15 <211> 82

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Polipéptido sintético

<400> 68

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
35 40 45

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala
50 55 60

Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
65 70 75 80

Leu Pro

<210> 69

<400> 69
000

<210> 70

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 70

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
50 55 60

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
65 70 75 80

Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 71

<211> 93

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 563 091 T3

<223> Polipéptido sintético

<400> 71

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1          5          10          15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
          20          25          30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
          35          40          45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 50          55          60

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 65          70          75          80

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
          85          90
    
```

5 <210> 72
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 72

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1          5          10          15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
          20          25          30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          35          40          45

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys
 50          55          60

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
 65          70          75          80

Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu
          85          90          95

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
          100          105
    
```

15 <210> 73
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 563 091 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 73

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1          5          10          15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
          20          25          30

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu
          35          40          45

Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp
          50          55          60

Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg
65          70          75          80

Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
          85          90
    
```

5

<210> 74

<211> 103

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 74

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1          5          10          15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
          20          25          30

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
          35          40          45

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu
          50          55          60

Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn
65          70          75          80

Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu
          85          90          95

His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
          100
    
```

15

<210> 75

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

ES 2 563 091 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 75

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1           5           10           15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20           25           30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Gly Gly Gly
 35           40           45

Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 50           55           60

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala
 65           70           75           80

Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 85           90           95
    
```

5

Leu Pro

<210> 76

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 76

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1           5           10           15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20           25           30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Gly Gly Gly
 35           40           45

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
 50           55           60

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 65           70           75           80

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu
 85           90           95

Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 100           105           110
    
```

15

<210> 77

<211> 88

ES 2 563 091 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 77

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1          5          10          15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
          20          25          30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
          35          40          45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
          50          55          60

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
65          70          75          80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
          85
    
```

10 <210> 78
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 78

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1          5          10          15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
          20          25          30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
          35          40          45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
          50          55          60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65          70          75          80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
          85
    
```

20 <210> 79
<211> 86
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 563 091 T3

<223> Polipéptido sintético

<400> 79

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
50 55 60

Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

5

<210> 80

<211> 77

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 80

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

15

<210> 81

<211> 77

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 81

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

<210> 82
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polipéptido sintético

10

<400> 82

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
50 55 60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 83
<211> 86
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Polipéptido sintético

20

<400> 83

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
50 55 60

Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 84

<211> 93

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 84

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Gly Leu
35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
65 70 75 80

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 85

<211> 88

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido sintético

20

<400> 85

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
50 55 60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 86
<211> 77
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polipéptido sintético

10

<400> 86

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

<210> 87
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Polipéptido sintético

20

<400> 87

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
50 55 60

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 88

<211> 86

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 88

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 89

<211> 77

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <400> 89

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu

20

25

30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 50 55 60

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75

<210> 90

<211> 77

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 90

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 50 55 60

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75

<210> 91

<211> 88

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <400> 91

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
50 55 60

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 92

<211> 86

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 92

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 93

<211> 93

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <400> 93

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Gly Leu
 35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 50 55 60

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 65 70 75 80

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85 90

5 <210> 94
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 94

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
 35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
 50 55 60

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
 65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85

15 <210> 95
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 95

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
 35 40 45
 Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
 50 55 60
 Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
 65 70 75 80
 Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85

<210> 96
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 96

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
 35 40 45
 Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
 50 55 60
 Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
 65 70 75 80
 Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85

<210> 97
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido sintético

20

<400> 97

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

5 <210> 98
<211> 77
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 98

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

15 <210> 99
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 99

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
 35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
 50 55 60

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
 65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85

<210> 100
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 100

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
 35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
 50 55 60

Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
 65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85

<210> 101
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido sintético

20

<400> 101

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Ser Leu
 35 40 45
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 50 55 60
 Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
 65 70 75 80
 Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85 90

<210> 102
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 102

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 50 55 60
 Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 65 70 75

<210> 103
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido sintético

20

<400> 103

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
50 55 60

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 104

<211> 86

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 104

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 105

<211> 77

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <400> 105

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

<210> 106
<211> 77
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polipéptido sintético

10

<400> 106

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Ser Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
50 55 60

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

<210> 107
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Polipéptido sintético

20

<400> 107

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
35 40 45

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
50 55 60

Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 108

<211> 86

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 108

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
35 40 45

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
65 70 75 80

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85

<210> 109

<211> 93

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <400> 109

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

ES 2 563 091 T3

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Ser Leu
 35 40 45

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 50 55 60

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 65 70 75 80

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 85 90

<210> 110

5 <400> 110
 000

<210> 111

<211> 37

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 111

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser
 35

<210> 112

<211> 38

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

25 <400> 112

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser
 35

<210> 113

<211> 38

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 113

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser
35

<210> 114

<211> 43

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 114

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40

<210> 115

20

<211> 45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Polipéptido sintético

<400> 115

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

<210> 116

30

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Polipéptido sintético

<400> 116

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 35 40

<210> 117
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 117

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 35 40

<210> 118
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido sintético

20

<400> 118

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 35 40

<210> 119
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Polipéptido sintético

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Y o F

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser N, R o S
 5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser V, I, L, M, F o Y
 10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser N, S, E o D
 15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser R, K o N
 20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa puede ser K o R
 25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa puede ser D, N, Q, E, H, S, R o K
 30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa puede ser K, I o T
 35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa puede ser A, S, T, G, H, L o D
 40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa puede ser H, E o D
 45

<400> 119
 Gly Val Ser Asp Xaa Tyr Lys Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Ala Xaa Thr Val
 1 5 10 15

Glu Gly Val Xaa Ala Leu Xaa Xaa Xaa Ile
 20 25

<210> 120
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético
 55

<400> 120

ES 2 563 091 T3

Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val
1 5 10 15

Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile
20 25

- 5 <210> 121
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Polipéptido sintético
- 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser V o E
- 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser L, E o D
- 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser N, L o I
- 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser R o K
- 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser D o K
- 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa puede ser Y o F
- 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa puede ser N, R o S
- 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa puede ser V, I, L, M, F o Y
- 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa puede ser N, S, E o D
- 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser R, K o N
- 60 <220>

ES 2 563 091 T3

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Asp Ala Ile Lys Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Thr Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

5 <210> 124
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

10 <400> 124

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Asp Ala Ile Lys Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Ile Ser Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

15 <210> 125
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

20 <400> 125

Gly Gly Gly Gly
 1

25 <210> 126
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

30 <400> 126

Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

35 <210> 127
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(6)
 <223> Xaa puede ser Gly o estar ausente

<400> 127

Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Glu
1 5

<210> 128
<211> 7
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Polipéptido sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(6)
15 <223> Xaa puede ser Gly o estar ausente

<400> 128

Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Lys
1 5

<210> 129
<211> 7
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Polipéptido sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(6)
30 <223> Xaa puede ser Gly o estar ausente

<400> 129

Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Asp
1 5

<210> 130
<211> 7
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Polipéptido sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(6)
45 <223> Xaa puede ser Gly o estar ausente

<400> 130

Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

<210> 131
<211> 8
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Polipéptido sintético

<400> 131

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 132

| | | |
|----|---|--|
| | <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 5 | <220> <223> Polipéptido sintético <400> 132 | Gly Gly Gly Asn Gly Ser Gly Gly 1 5 |
| 10 | <210> 133 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 15 | <220> <223> Polipéptido sintético <400> 133 | Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly 1 5 |
| 20 | <210> 134 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 25 | <220> <223> Polipéptido sintético <400> 134 | Gly Pro Asn Gly Gly 1 5 |
| 30 | <210> 135 <211> 2 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> <223> Polipéptido sintético <400> 135 | Gly Ser 1 |
| 40 | <210> 136 <211> 3 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> <223> Polipéptido sintético <400> 136 | Gly Gly Ser 1 |
| 50 | <210> 137 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> <223> Polipéptido sintético <400> 137 | |

| | | |
|----|-----------------------------|----------------------------|
| | | Gly Gly Gly Ser |
| | | 1 |
| | <210> 138 | |
| | <211> 5 | |
| 5 | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Polipéptido sintético | |
| 10 | <400> 138 | |
| | | Gly Gly Gly Gly Ser |
| | | 1 5 |
| | <210> 139 | |
| | <211> 2 | |
| 15 | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Polipéptido sintético | |
| 20 | <400> 139 | |
| | | Gly Glu |
| | | 1 |
| | <210> 140 | |
| | <211> 3 | |
| 25 | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Polipéptido sintético | |
| 30 | <400> 140 | |
| | | Gly Gly Glu |
| | | 1 |
| | <210> 141 | |
| | <211> 4 | |
| 35 | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Polipéptido sintético | |
| 40 | <400> 141 | |
| | | Gly Gly Gly Glu |
| | | 1 |
| | <210> 142 | |
| | <211> 5 | |
| 45 | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Polipéptido sintético | |
| 50 | <400> 142 | |
| | | Gly Gly Gly Gly Glu |
| | | 1 5 |
| | <210> 143 | |
| | <211> 2 | |
| 55 | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |

| | | |
|----|---|--|
| | <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 143 | Gly Asp 1 |
| 5 | <210> 144 <211> 3 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 144 | Gly Gly Asp 1 |
| 15 | <210> 145 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 145 | Gly Gly Gly Asp 1 |
| 25 | <210> 146 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 146 | Gly Gly Gly Gly Asp 1 5 |
| 35 | <210> 147 <211> 2 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 147 | Gly Lys 1 |
| 45 | <210> 148 <211> 3 <212> PRT <213> Secuencia artificial | |
| 50 | <220> <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 148 | Gly Gly Lys 1 |
| 55 | <210> 149 <211> 4 <212> PRT | |

| | | |
|----|-----------------------------|--|
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 5 | <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 149 | Gly Gly Gly Lys 1 |
| | <210> 150 | |
| 10 | <211> 5 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 150 | Gly Gly Gly Gly Lys 1 5 |
| | <210> 151 | |
| 20 | <211> 2 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 25 | <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 151 | Gly Arg 1 |
| | <210> 152 | |
| 30 | <211> 3 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 35 | <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 152 | Gly Gly Arg 1 |
| | <210> 153 | |
| 40 | <211> 4 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 45 | <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 153 | Gly Gly Gly Arg 1 |
| | <210> 154 | |
| 50 | <211> 5 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 55 | <223> Polipéptido sintético | |
| | <400> 154 | Gly Gly Gly Gly Arg 1 5 |

ES 2 563 091 T3

<210> 155
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 155
 Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5
 10
 <210> 156
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 156
 20
 Met Ala His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
 1 5 10 15
 Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
 20 25 30
 Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
 35 40 45
 Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala
 85 90 95
 Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
 100 105 110
 Leu Pro
 <210> 157
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 157
 30

ES 2 563 091 T3

Met Ala His His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
20 25 30

Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
35 40 45

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
50 55 60

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu
65 70 75 80

Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His
85 90 95

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
100

<210> 158
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polipéptido sintético

10

<400> 158

Met Ala His His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
20 25 30

Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
35 40 45

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
50 55 60

Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu
65 70 75 80

Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala
85 90 95

Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala
100 105 110

Leu Pro

<210> 159
<211> 102
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

ES 2 563 091 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 159

```

Met Ala His His His His His His Val Gly Thr Gly Ser Asn Glu Asn
 1                    5                10                15

Leu Tyr Phe Gln His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys
                20                25                30

Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
                35                40                45

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
 50                55                60

Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile
65                70                75                80

Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His
                85                90                95

Ile Leu Ala Ala Leu Pro
                100
    
```

5

<210> 160

<211> 263

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 160

```

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
 1                    5                10                15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
                20                25                30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
 35                40                45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
 50                55                60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65                70                75                80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
                85                90                95
    
```

ES 2 563 091 T3

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
 100 105 110

Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
 130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln His
 145 150 155 160

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu
 165 170 175

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
 180 185 190

Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 195 200 205

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
 210 215 220

Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
 225 230 235 240

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
 245 250 255

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
 260

<210> 161

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 161

ES 2 563 091 T3

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
 1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
 20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
 35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
 50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
 65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
 85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
 100 105 110

Ser Gly His Met His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
 130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln His
 145 150 155 160

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
 165 170 175

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly Gly
 180 185 190

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu
 195 200 205

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 210 215 220

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys Thr Val Glu Gly
 225 230 235 240

Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 245 250

<210> 162

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 162

```

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1           5           10           15
Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
20           25           30
Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
35           40           45
Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
50           55           60
Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65           70           75           80
Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
85           90           95
Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
100          105          110
Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
115          120          125
Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
130          135          140
His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln His
145          150          155          160
Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
165          170          175
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Thr Gly Gly Gly Gly
180          185          190
Ser Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp
195          200          205
Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Asn Arg Ala Lys
210          215          220
Thr Val Glu Gly Val Arg Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
225          230          235          240

```

Pro

5 <210> 163
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

ES 2 563 091 T3

<400> 163

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Glu Ile Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu
35 40 45

Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp
50 55 60

Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu
65 70 75 80

Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
85 90

<210> 164

<211> 74

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 164

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 Leu Ala Glu Ala
20 25 30

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe
35 40 45

Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala
50 55 60

Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70

<210> 165

<211> 73

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20

<400> 165

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Leu Ala Glu Ala Lys
20 25 30

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr
35 40 45

Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu
50 55 60

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70

<210> 166

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 166

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Tyr
35 40 45

Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
50 55 60

Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70 75

<210> 167

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido sintético

20

<400> 167

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
35 40 45

Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
50 55 60

Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
65 70

<210> 168
<211> 89
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 168

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Lys Asn Ala Lys Glu
35 40 45

Asp Ala Ile Ala Glu Leu Lys Lys Ala Gly Ile Thr Ser Asp Phe Tyr
50 55 60

Phe Asn Ala Val Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Glu Val Asn Ala Leu
65 70 75 80

Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala Leu Pro
85

<210> 169
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 169

ES 2 563 091 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

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

Met Ala Ile Arg Glu Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys
50 55 60

Asp Lys Ile Asp Asp Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Val Ala Leu Lys
65 70 75 80

Asp Leu Ile Leu Asn Ser Leu Pro
85

<210> 170

<211> 88

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 170

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Ser Leu Ala Lys Ala Lys Ala
35 40 45

Asp Ala Ile Glu Ile Leu Lys Lys Tyr Gly Ile Gly Asp Tyr Tyr Ile
50 55 60

Lys Leu Ile Asn Asn Gly Lys Thr Ala Glu Gly Val Thr Ala Leu Lys
65 70 75 80

Asp Glu Ile Leu Ala Ser Leu Pro
85

<210> 171

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

25 <400> 171

ES 2 563 091 T3

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr Tyr Gly Val
 20 25 30

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
 35 40 45

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 50 55 60

<210> 172

<211> 61

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 172

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr Tyr Gly Val
 20 25 30

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
 35 40 45

Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 50 55 60

<210> 173

<211> 65

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <400> 173

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr Gly Gly Gly
 20 25 30

Ser Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys
 35 40 45

Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
 50 55 60

Pro
 65

<210> 174
 <400> 174
 000
 5
 <210> 175
 <400> 175
 000
 10
 <210> 176
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 176
 Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr
 1 5 10 15
 Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45
 20
 <210> 177
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 177
 Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr
 1 5 10 15
 Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val
 20 25 30
 Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
 35 40 45
 30
 <210> 178
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 178

ES 2 563 091 T3

Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 179

<211> 48

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 179

Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 180

<211> 47

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <400> 180

Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 181

<211> 47

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

30 <400> 181

ES 2 563 091 T3

Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu
35 40 45

5 <210> 182
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser V o E

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser L, E o D

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser N, L o I

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser R o K

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser D o K

35 <400> 182
Leu Ala Glu Ala Lys Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Glu Leu Xaa Lys Tyr

1 5 10 15

40 <210> 183
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

45 <400> 183

Leu Ala Ala Leu Pro
1 5

50 <210> 184
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 184

Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys
35 40 45

Lys Lys
50

5

<210> 185

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 185

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
20 25 30

Pro Ser Ser Gly Ala Ser
35

15

<210> 186

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 186

Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser
35 40

25

<210> 187

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 187

35

ES 2 563 091 T3

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

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser
35 40

<210> 188

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 188

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40

<210> 189

<211> 48

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido sintético

20

<400> 189

Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

<210> 190

<211> 48

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido sintético

30

<400> 190

ES 2 563 091 T3

Asp Glu Glu Glu Glu Glu His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
20 25 30

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

5 <210> 191
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 191

Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5

15 <210> 192
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 192

Gly Gly Gly Ser
1

25 <210> 193
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 193

Thr Gly Gly Gly Gly Ala Ser
1 5

35 <210> 194
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 194

Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser
1 5

45 <210> 195

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 195

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5

10

<210> 196
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 196

Gly Gly Gly Gly
1

20

<210> 197
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 197

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

30

<210> 198
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 198

Thr Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

40

<210> 199
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 199

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

50

<210> 200
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 200
Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 201
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

5

<400> 201
Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 202
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 202
Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser
20

<210> 203
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

15

<400> 203
Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5

<210> 204
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

20

<400> 204
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 205
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

25

<400> 205

30

35

40

45

50

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser

1 5 10

5 <210> 206
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10 <400> 206
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Ala Ser

15 <210> 207
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

20 <400> 207
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Ser
20

25 <210> 208
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

30 <400> 208
Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5

35 <210> 209
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

40 <400> 209
Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5 10

45 <210> 210
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 210

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
1 5 10 15

5

<210> 211
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 211

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

Gly Ser Ala Ser
20

15

<210> 212
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 212

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser
20

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido modificado genéticamente que comprende: una secuencia de polipéptido de dominio de unión a albúmina (ABD) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 35, y una primera secuencia de dominio de hormona peptídica (HD1) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3.
2. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido modificado genéticamente es estable en plasma y frente a proteasas en plasma.
- 10 3. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende además un primer enlazador (L1) que une covalentemente dicha secuencia de ABD y dicha secuencia de HD1.
- 15 4. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho polipéptido modificado genéticamente comprende dicha secuencia de ABD como un resto C terminal y dicha secuencia de HD1 como un resto N terminal y, opcionalmente, dicho polipéptido modificado genéticamente tiene una estructura seleccionada de:
- (a) HD1-ABD; y
(b) HD1-L1-ABD.
- 20 5. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 3 o con la reivindicación 4, en el que dicho enlazador L1 es un enlazador peptídico de 1 a 30 aminoácidos.
- 25 6. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho enlazador L1 se selecciona de los 20 aminoácidos de origen natural.
- 30 7. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho enlazador L1 comprende un aminoácido no natural incorporado por síntesis química, modificación química postraducciona l o por incorporación *in vivo* por expresión recombinante en una célula hospedadora.
- 35 8. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichos aminoácidos del enlazador L1 se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina.
9. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho enlazador L1 comprende poliglicina, polialanina, poli(Gly-Ala) o poli(Gly-Ser) y, opcionalmente, dicho enlazador L1 comprende la secuencia de aminoácidos (Gly)₃, (Gly)₄ (SEC ID N°:196), o (Gly)₅ (SEC ID N°:197).
- 40 10. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho enlazador L1 comprende la secuencia de aminoácidos (Gly)₃Lys(Gly)₄ (SEC ID N°: 131); (Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (SEC ID N°: 132); (Gly)₃Cys(Gly)₄ (SEC ID N°: 133); o GlyProAsnGlyGly (SEC ID N°: 134).
- 45 11. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho enlazador L1 comprende uno de los siguientes:
- (a) combinaciones de Gly y Ala;
(b) combinaciones de Gly y Ser;
(c) un dipéptido TG N terminal;
(d) un dipéptido AS C terminal; o
(e) un dipéptido TG N terminal y un dipéptido AS C terminal.
- 50 12. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho enlazador L1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de TG-(GGGS)₁ (SEC ID N°: 198), TG-(GGGS)₂ (SEC ID N°: 199), TG (GGGS)₃ (SEC ID N°: 200), TG-(GGGS)₄ (SEC ID N°: 201), TG-(GGGS)₅ (SEC ID N°: 202), (GGGS)₁-AS (SEC ID N°: 203), (GGGS)₂-AS (SEC ID N°: 204), (GGGS)₃-AS (SEC ID N°: 205), (GGGS)₄-AS (SEC ID N°: 206), (GGGS)₅-AS (SEC ID N°: 207), TG-(GGGS)₁-AS (SEC ID N°: 208), TG-(GGGS)₂-AS (SEC ID N°: 209), TG-(GGGS)₃-AS (SEC ID N°: 210), TG (GGGS)₄-AS (SEC ID N°: 211) y TG-(GGGS)₅-AS (SEC ID N°: 212) y, opcionalmente, dicho dipéptido TG o dipéptido AS de enlazador L1 están ausentes o se reemplazan por un par de aminoácidos seleccionados de T, A, S y G.
- 60 13. El polipéptido modificado genéticamente de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 95.
- 65 14. El polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno; opcionalmente, dicha enfermedad o dicho trastorno se selecciona de diabetes, prediabetes, sobrepeso, obesidad, enfermedad de Alzheimer, síndrome del

intestino corto, enfermedad de hígado graso, dislipidemia, enfermedad de las arterias coronarias, ictus, hiperlipidemia y enfermedad de Parkinson.

5 15. El polipéptido modificado genéticamente para el uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha enfermedad o dicho trastorno es diabetes de tipo I, diabetes de tipo II o prediabetes.

10 16. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido modificado genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y un excipiente farmacéuticamente aceptable; opcionalmente dicha composición farmacéutica se selecciona de

- (a) una composición farmacéutica oral; y
- (b) una composición farmacéutica de liberación sostenida o de larga duración.

Fig. 1A.

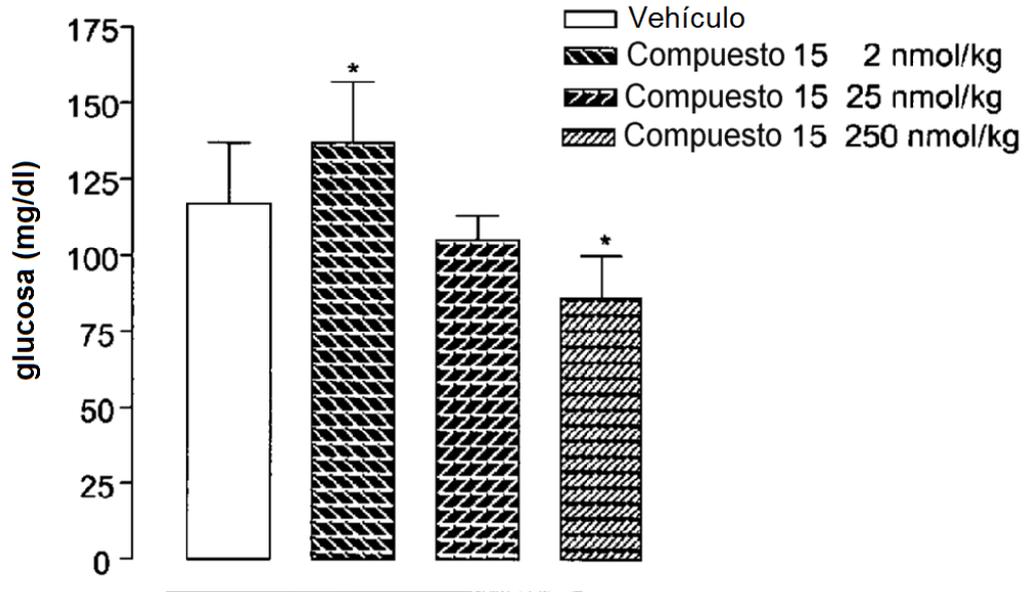


Fig. 1B

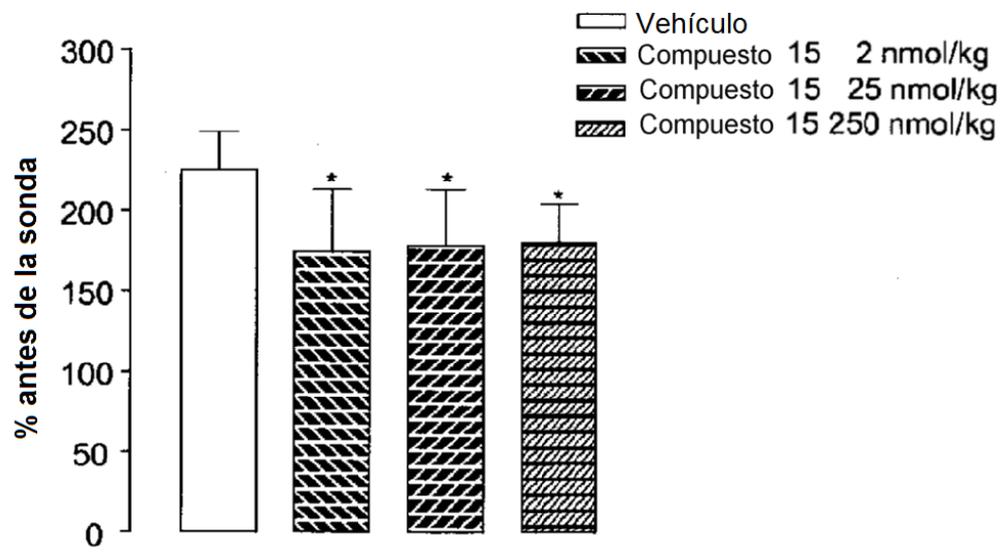


Fig. 2A.

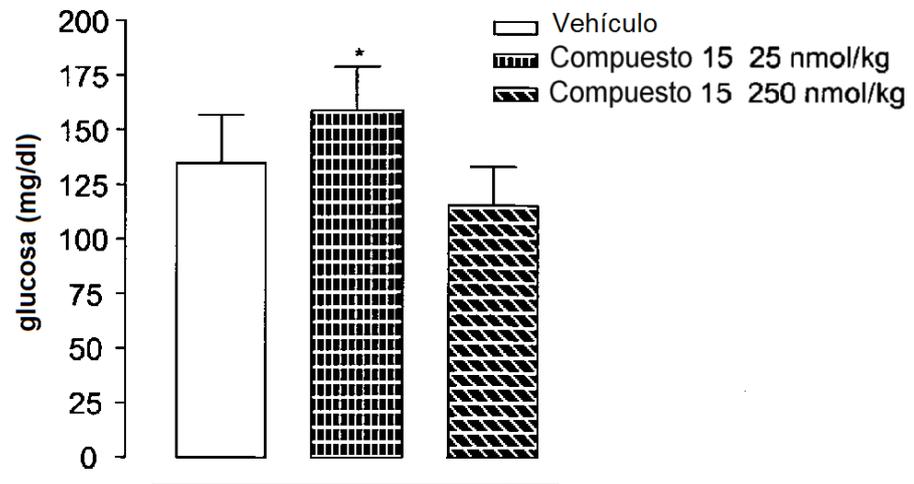


Fig. 2B.

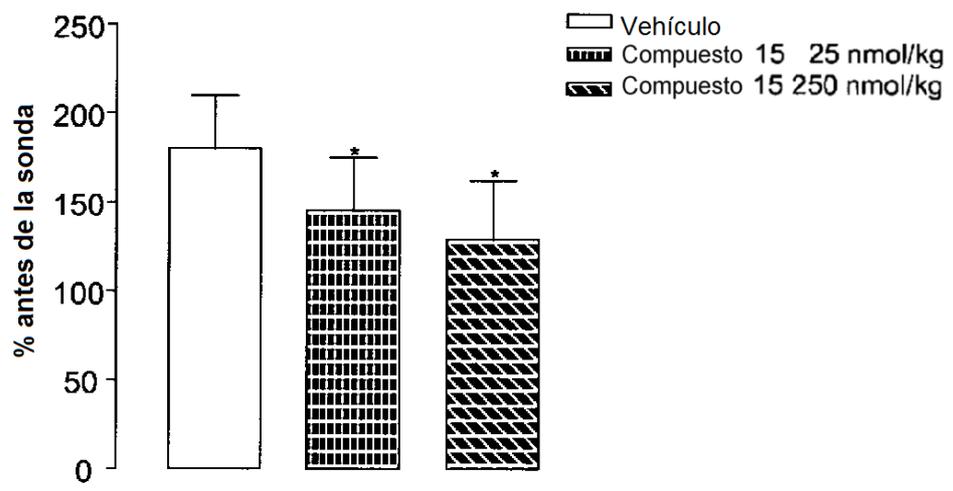


Fig. 3A.

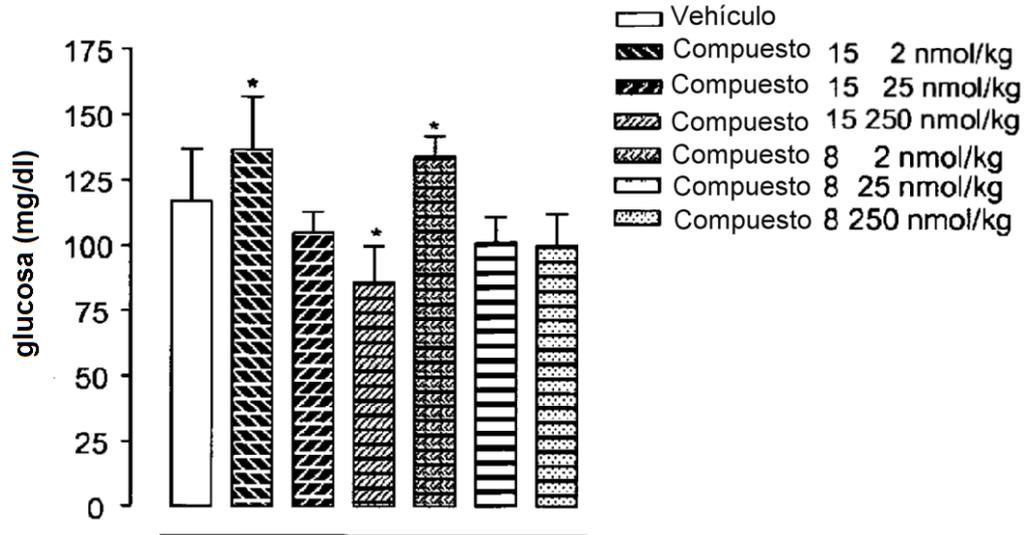


Fig. 3B.

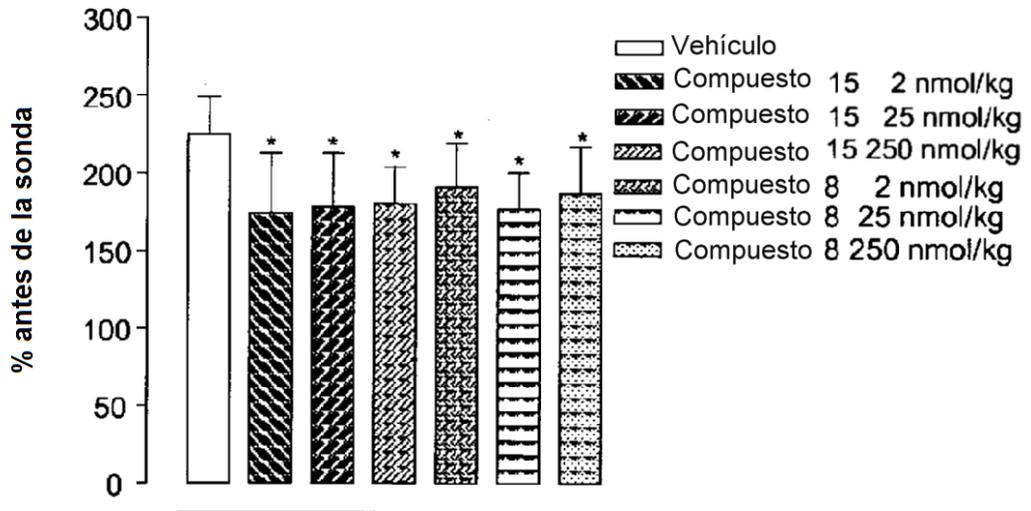


Fig. 4A.

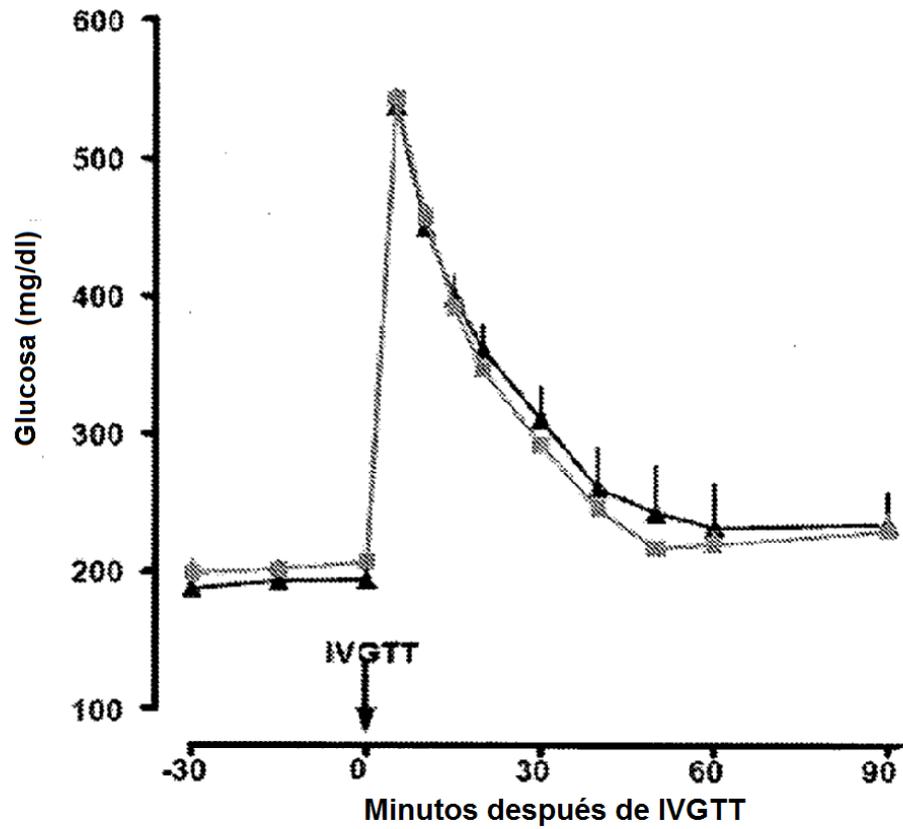


Fig. 4B

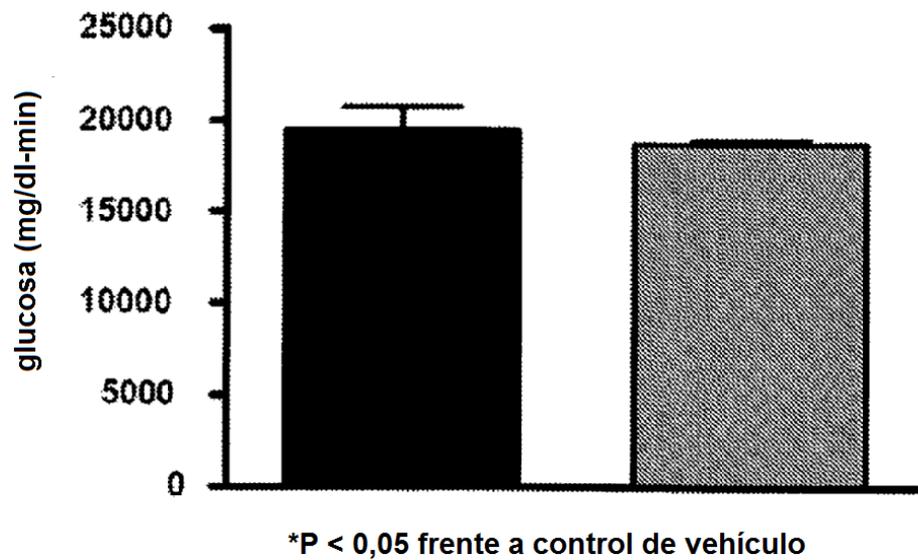


Fig. 4C.

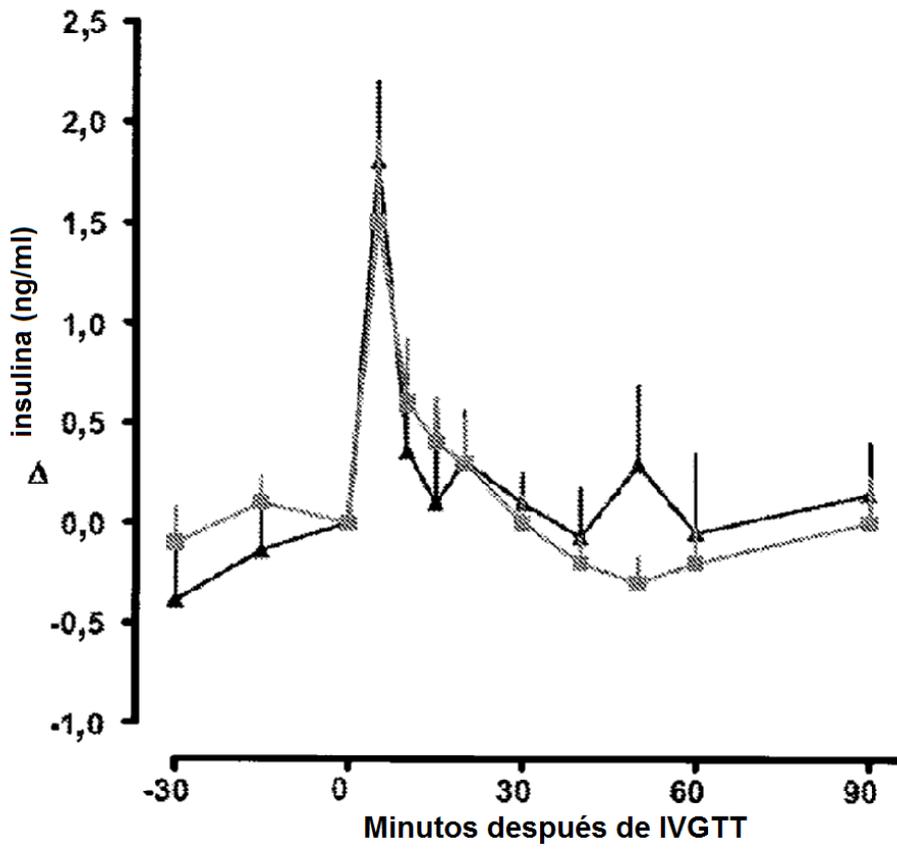


Fig. 4D.

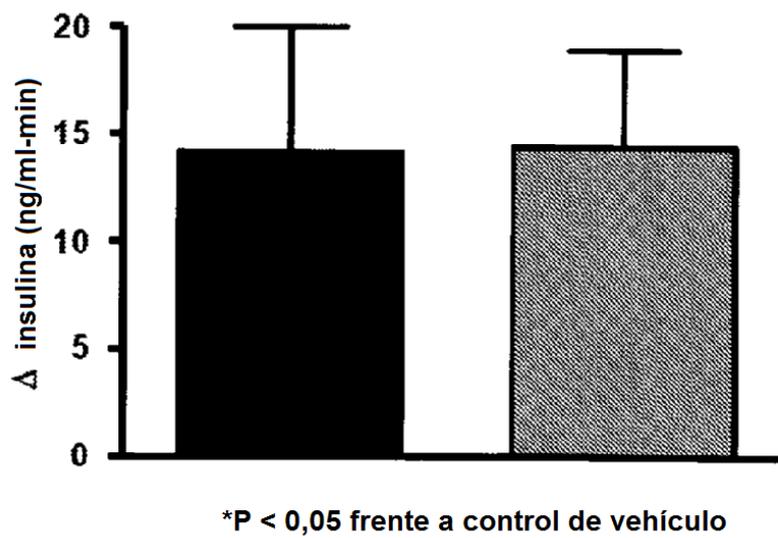


Fig. 4E.

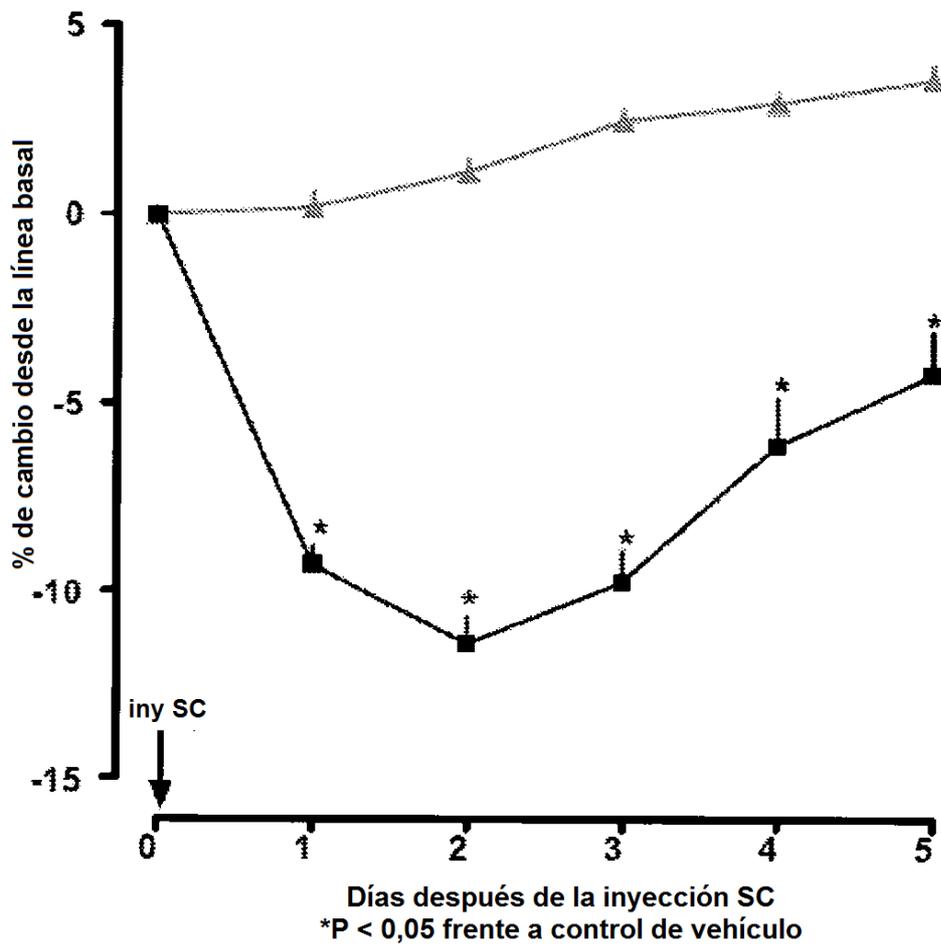


Fig. 4F.

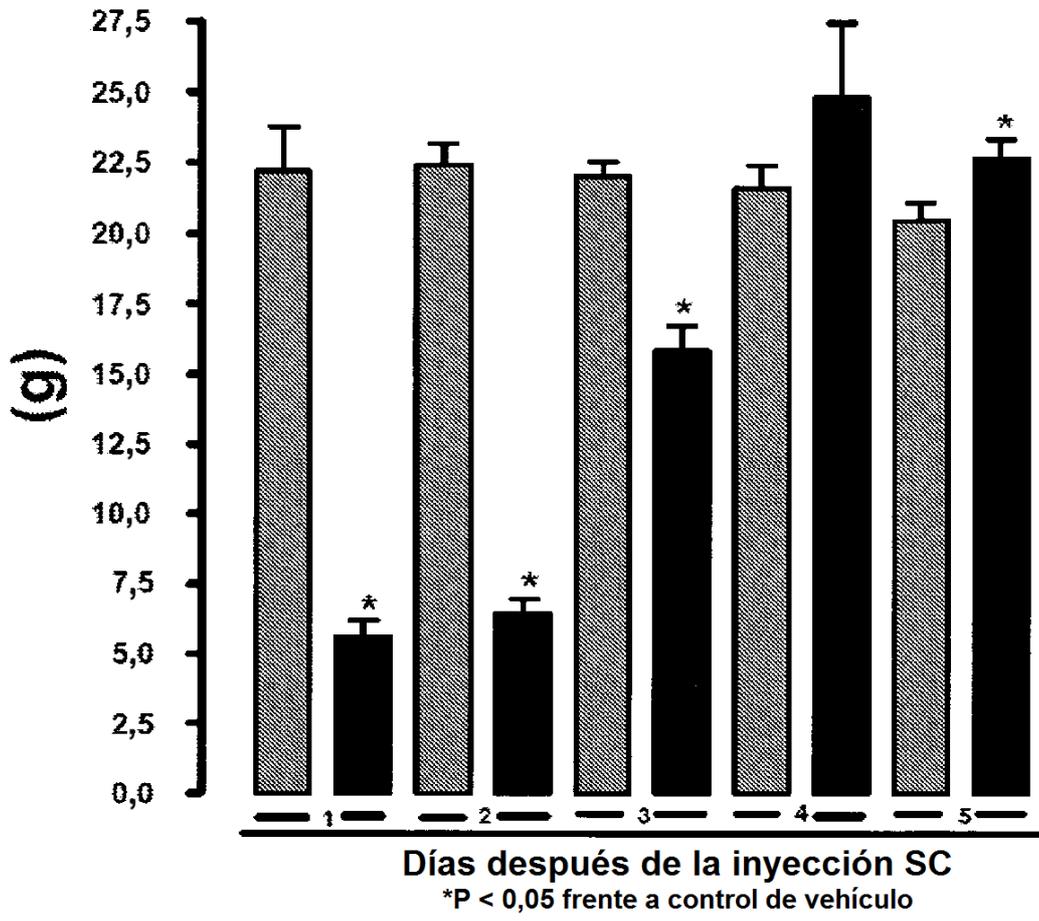


Fig. 5A.

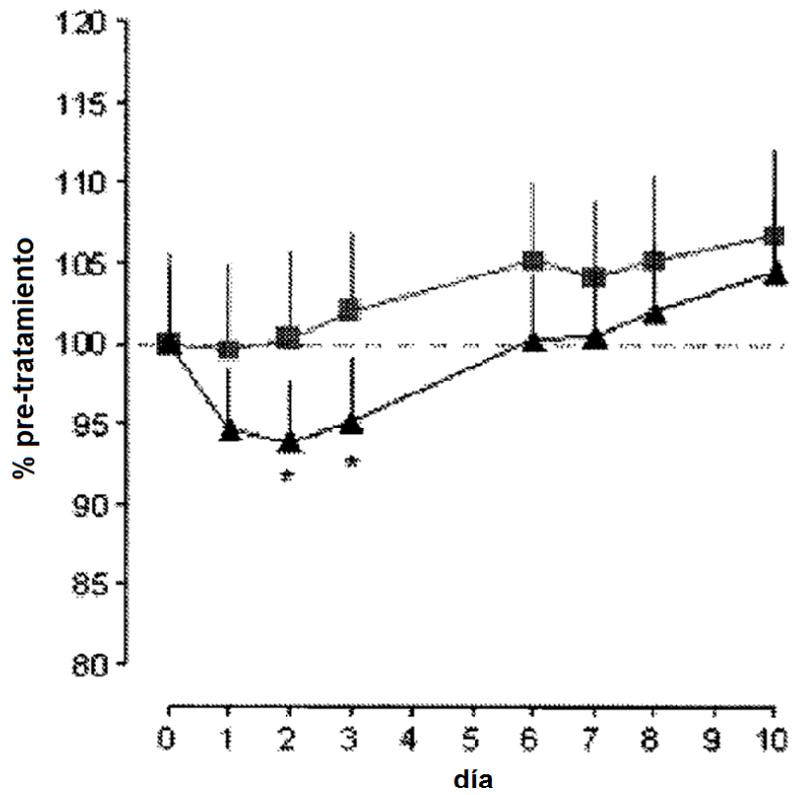


Fig. 5B.

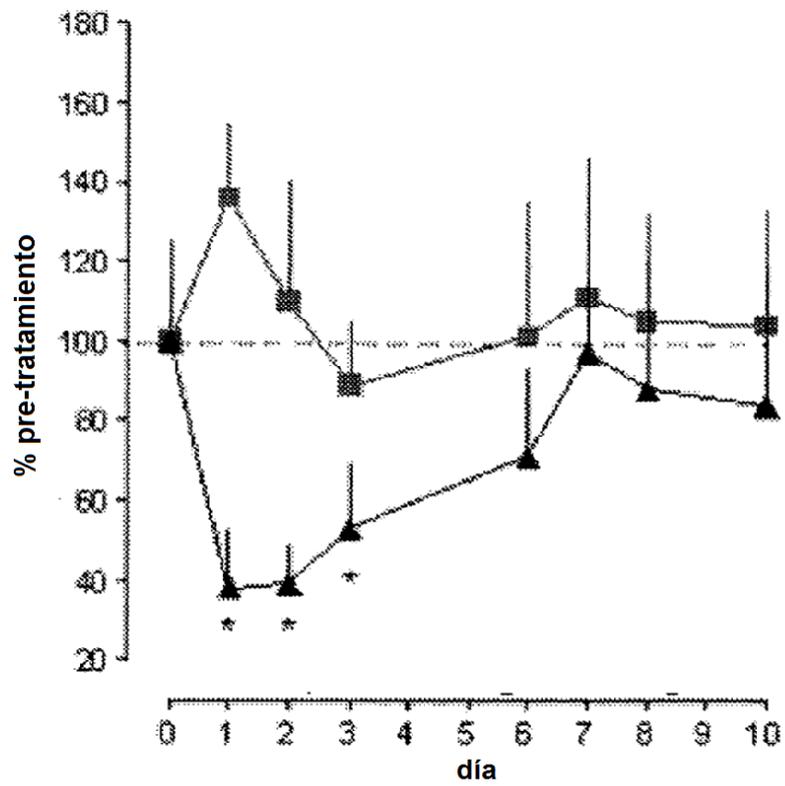


Fig. 5C.

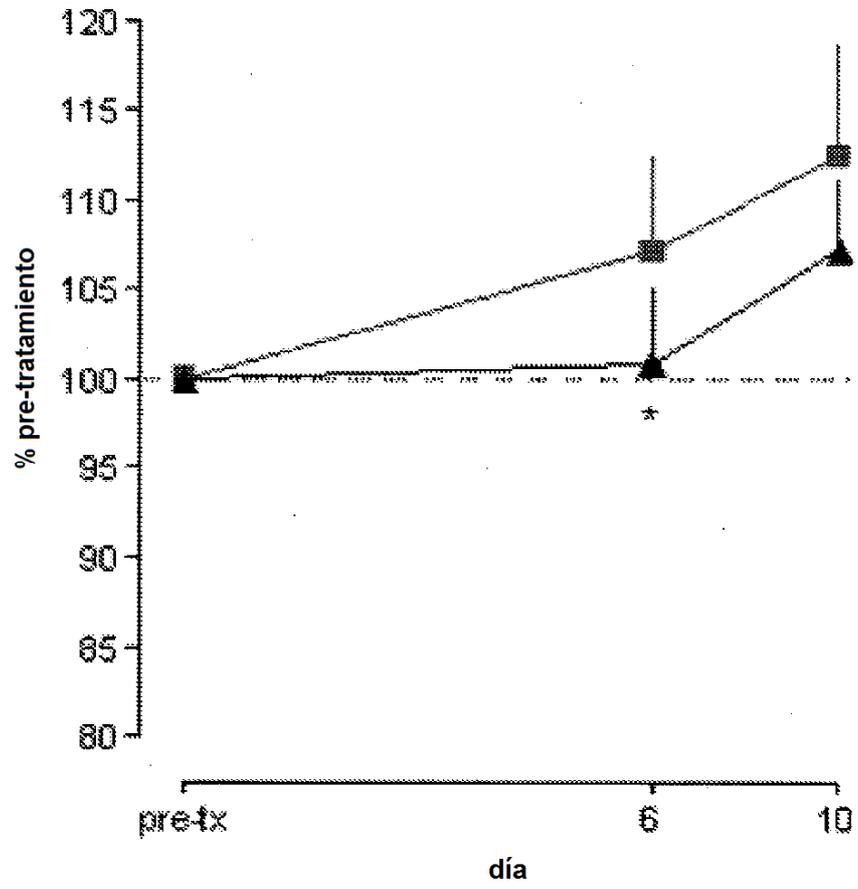


Fig. 6A

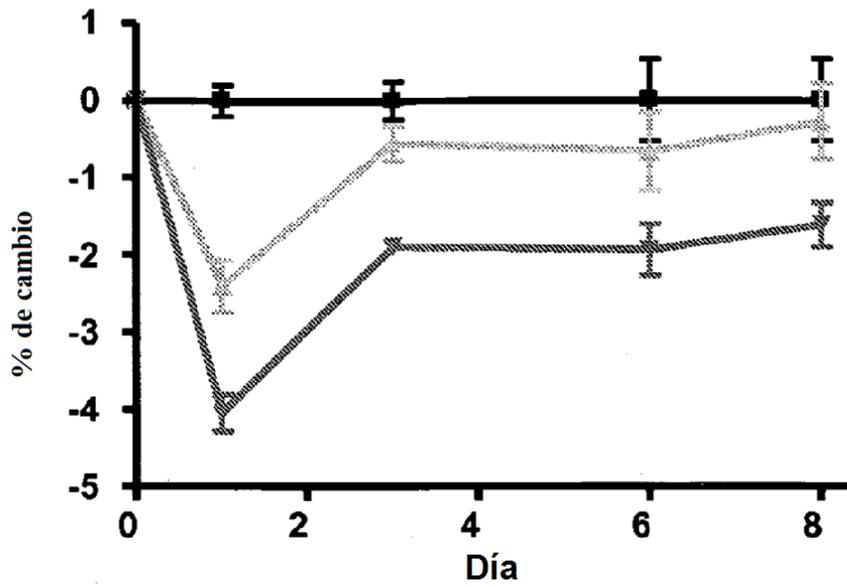
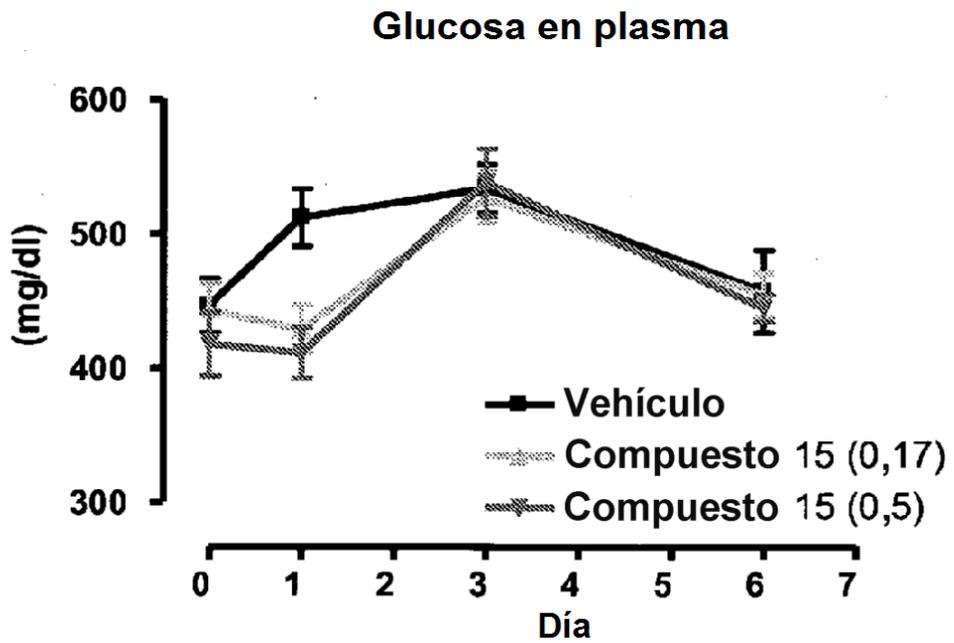


Fig. 6B.



* excluye las lecturas de glucómetro de HI (>600)

Fig. 7

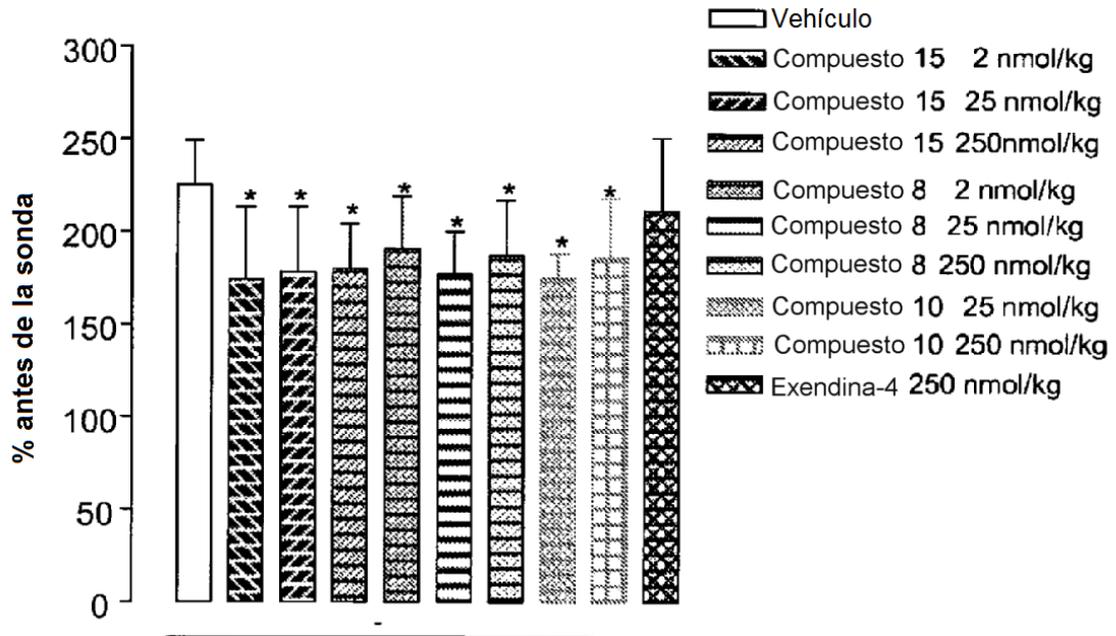


Fig. 8

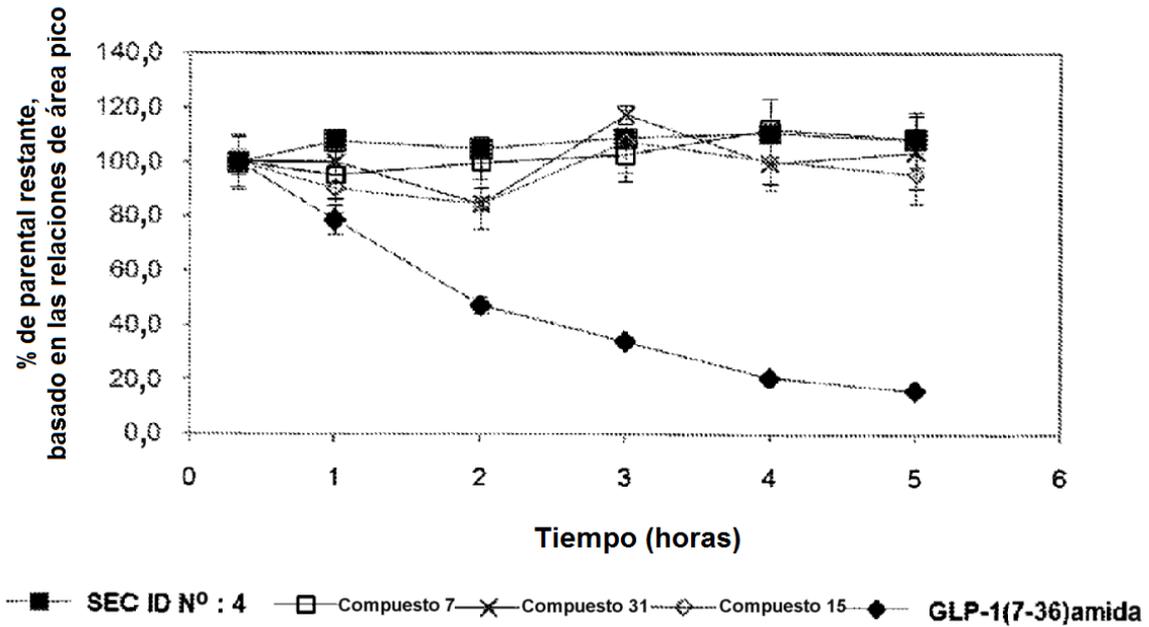


Fig. 9

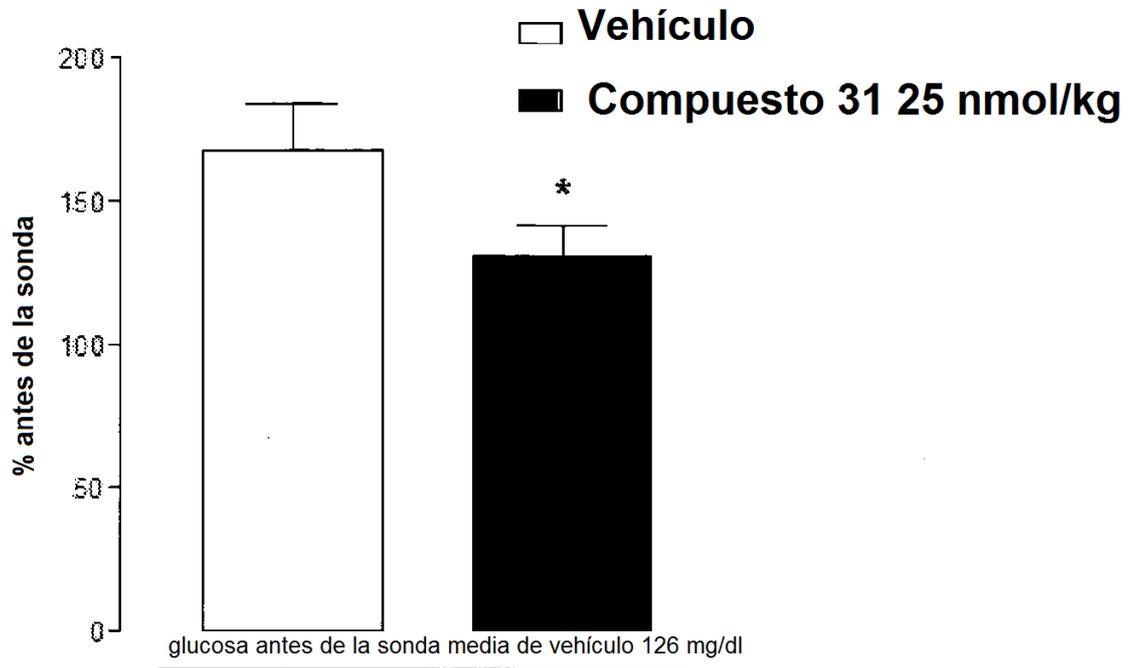


Fig. 10A

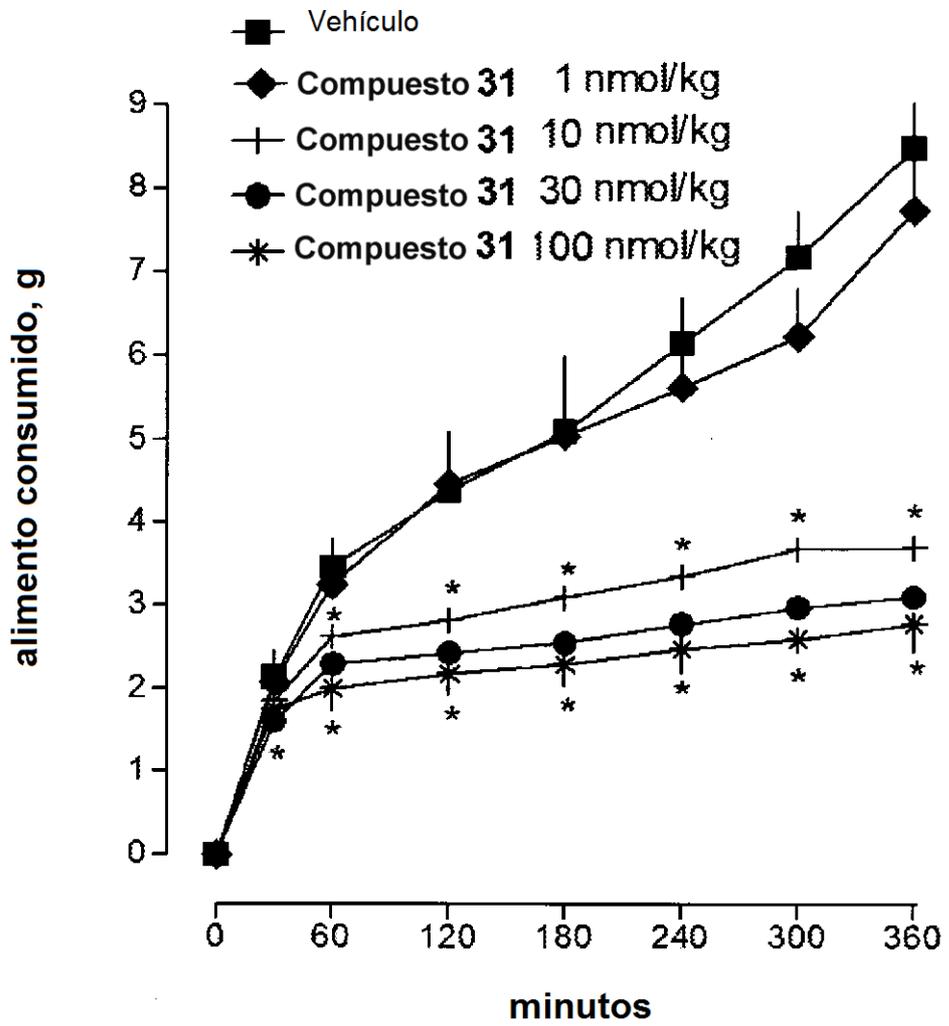


Fig 10B

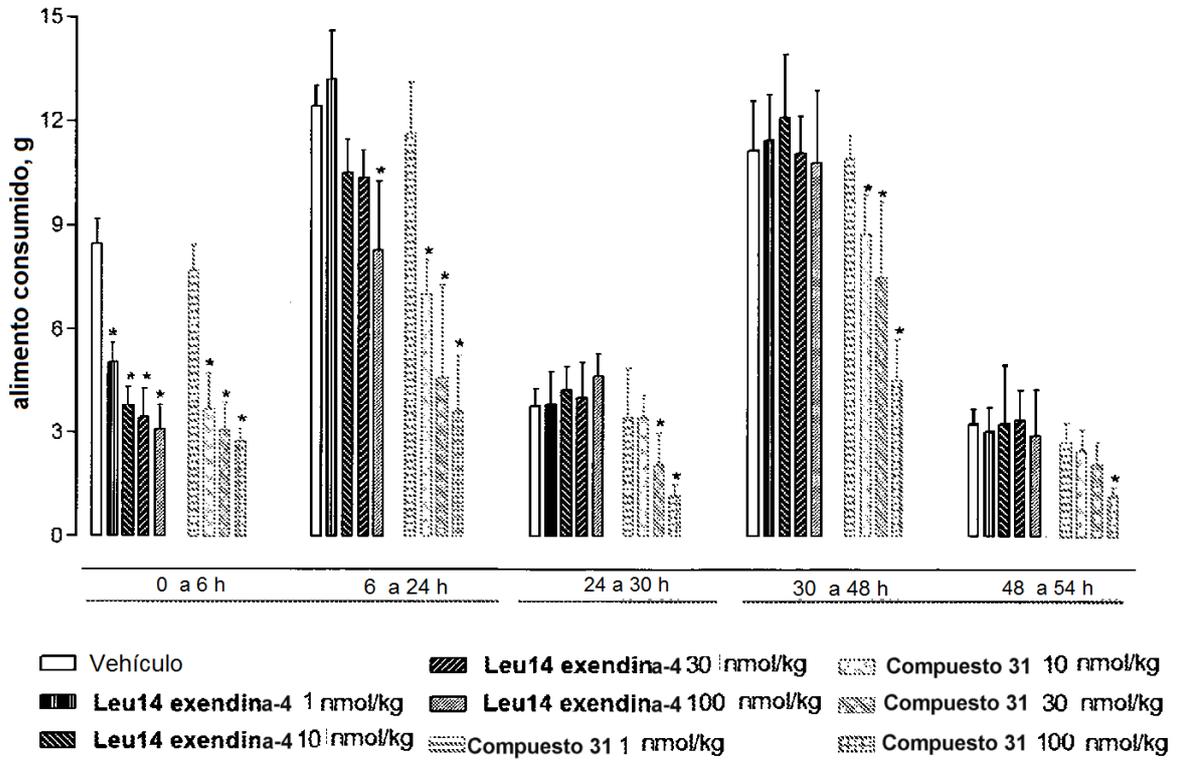


Fig. 11A

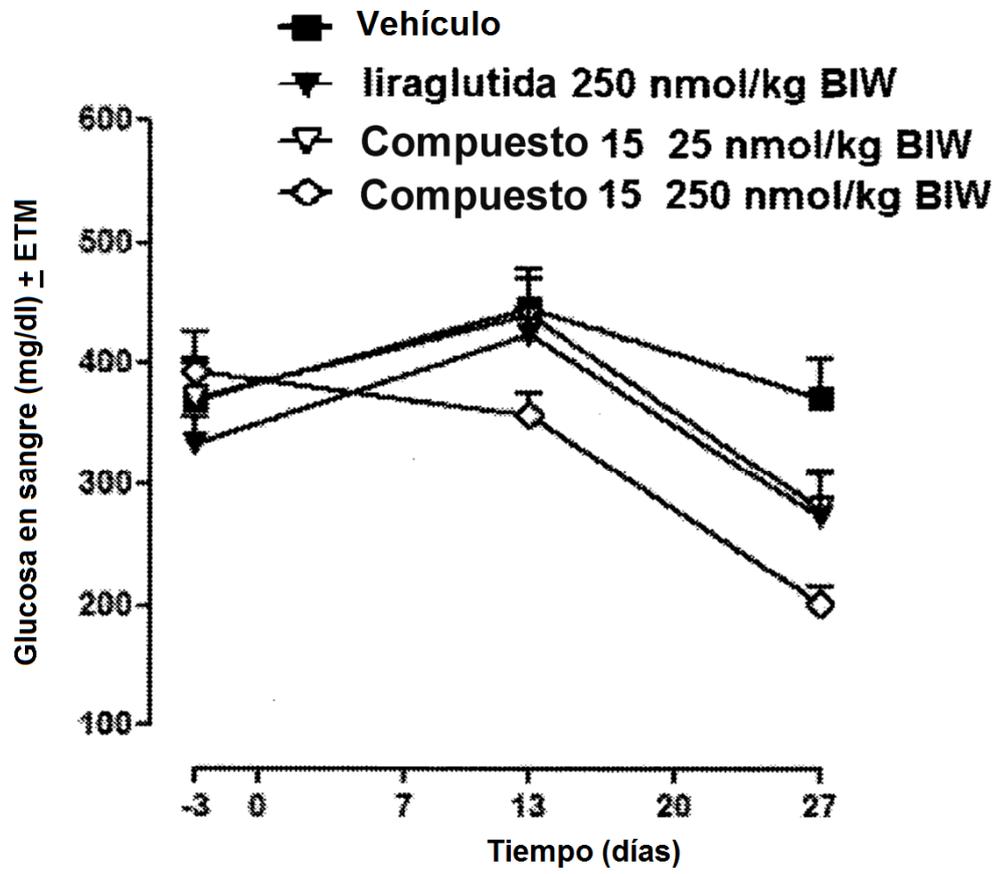


Fig 11B

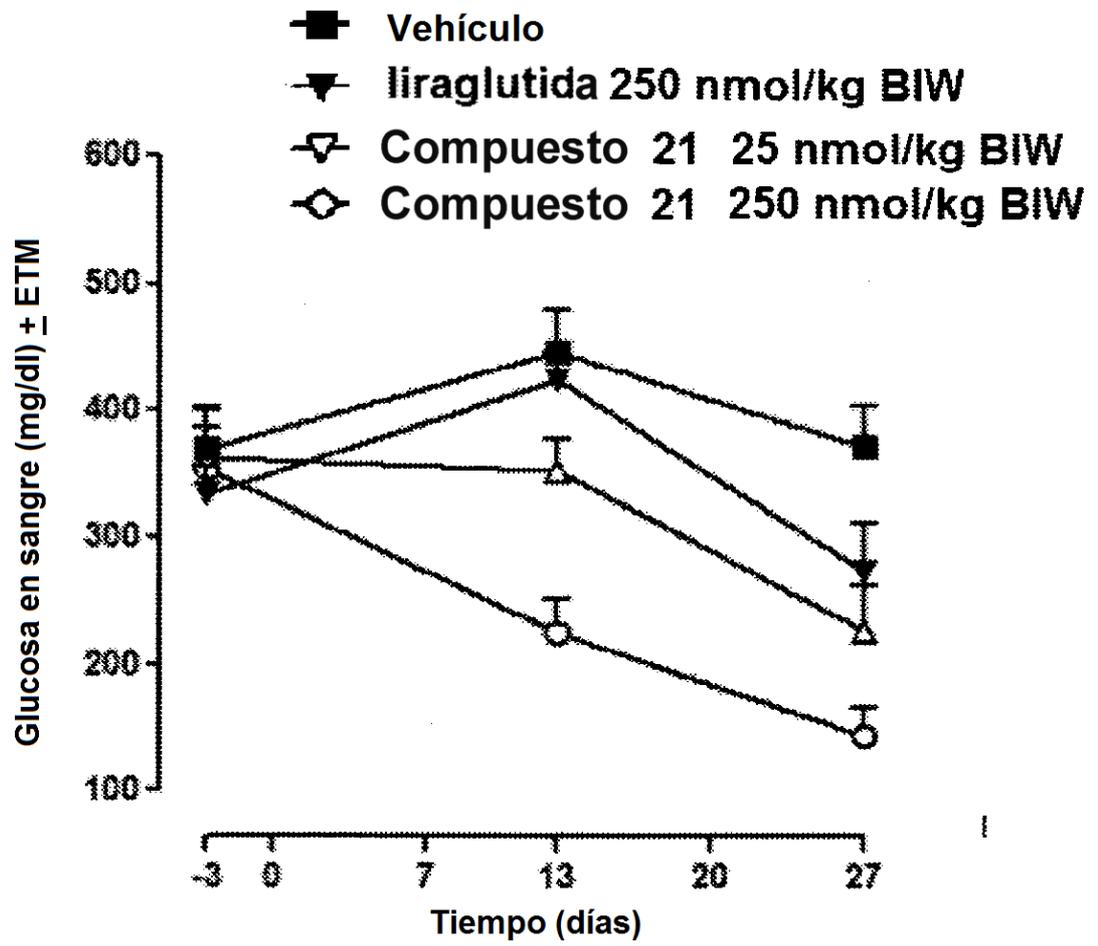


Fig. 11C

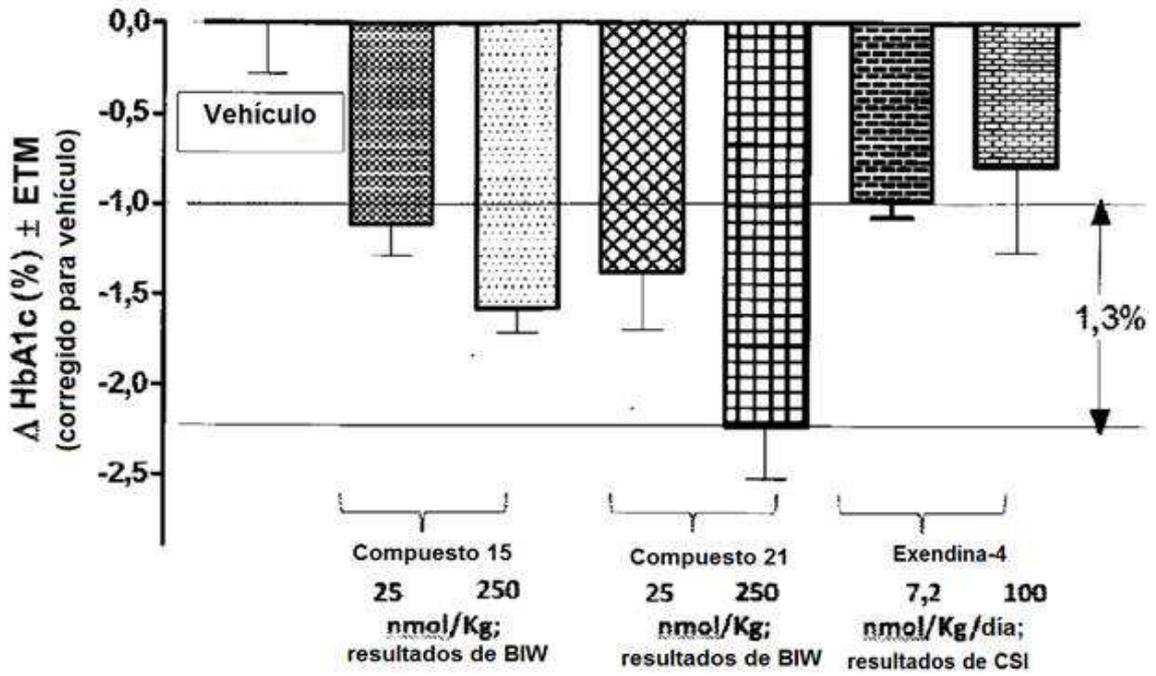


Fig. 11D

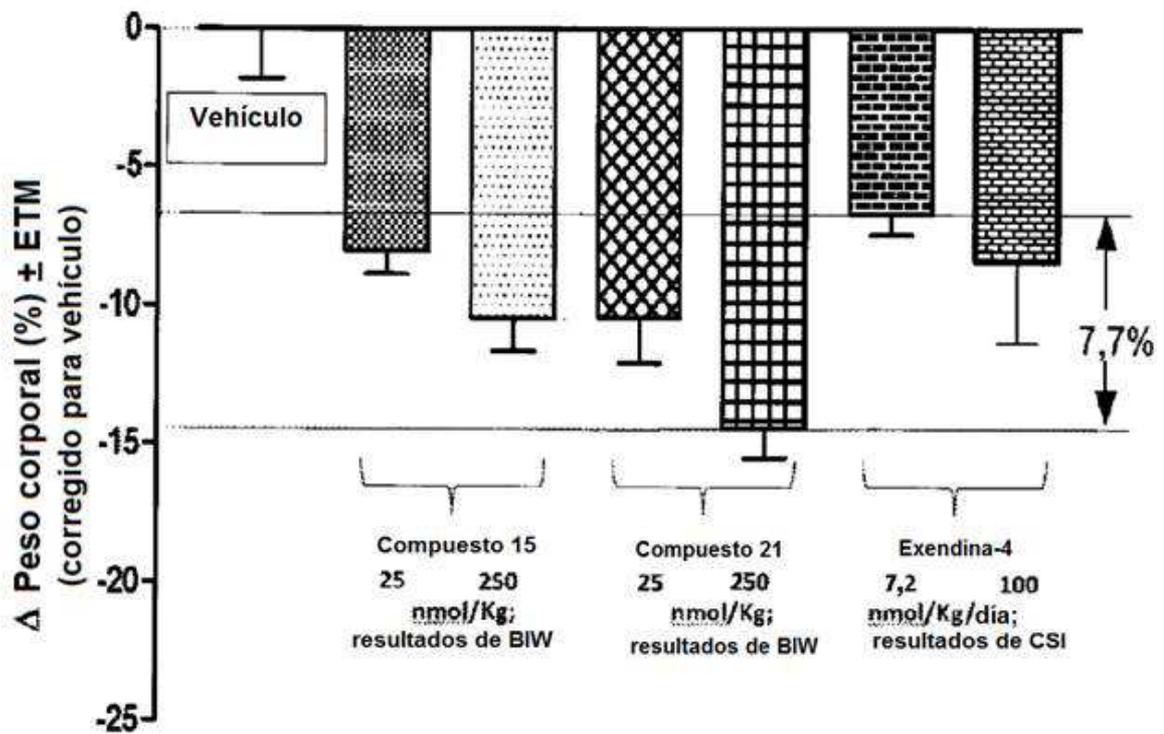


Fig. 12A

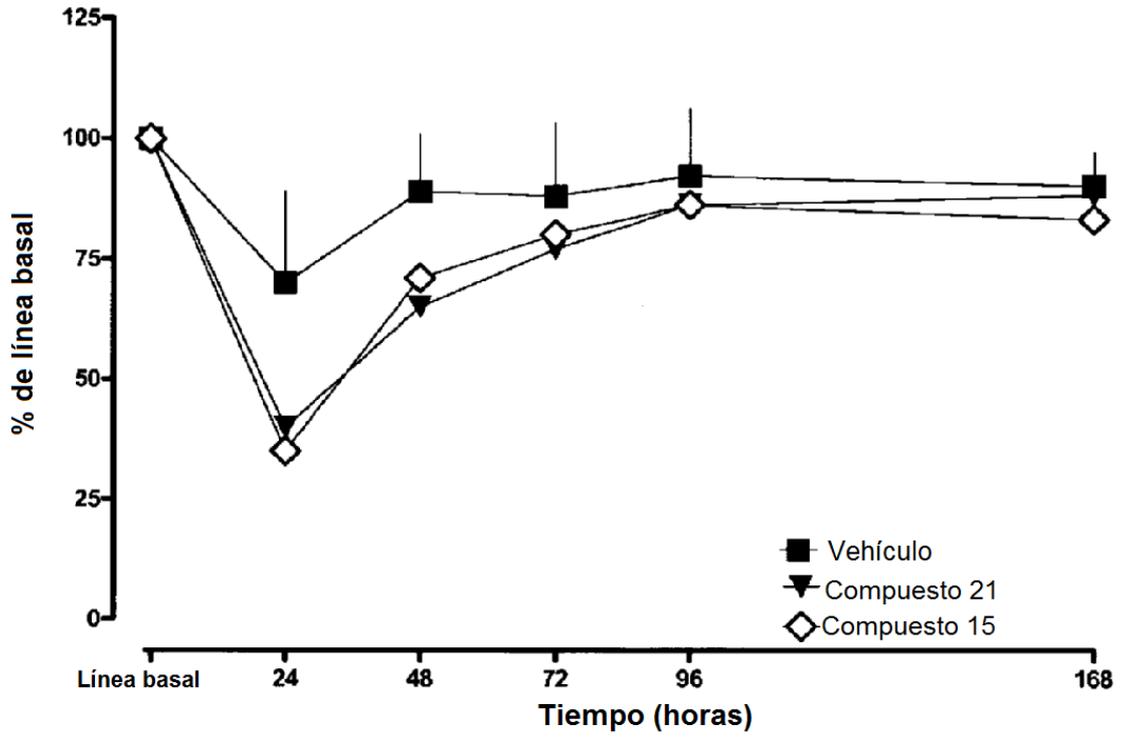


Fig. 12B

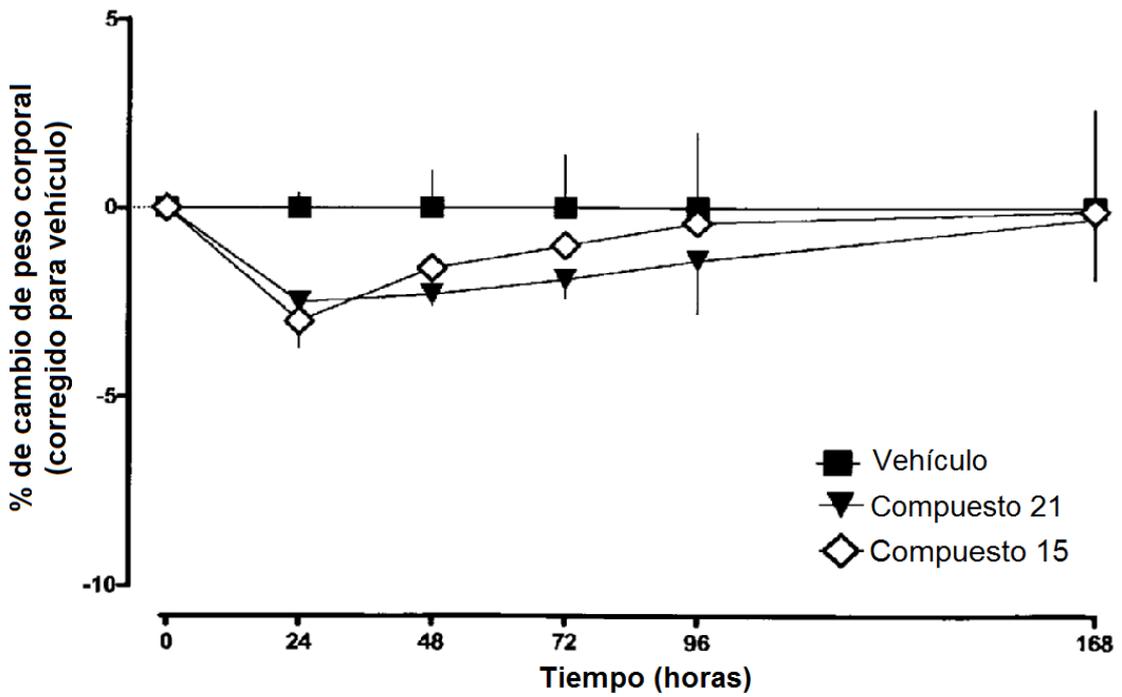


Fig. 12C

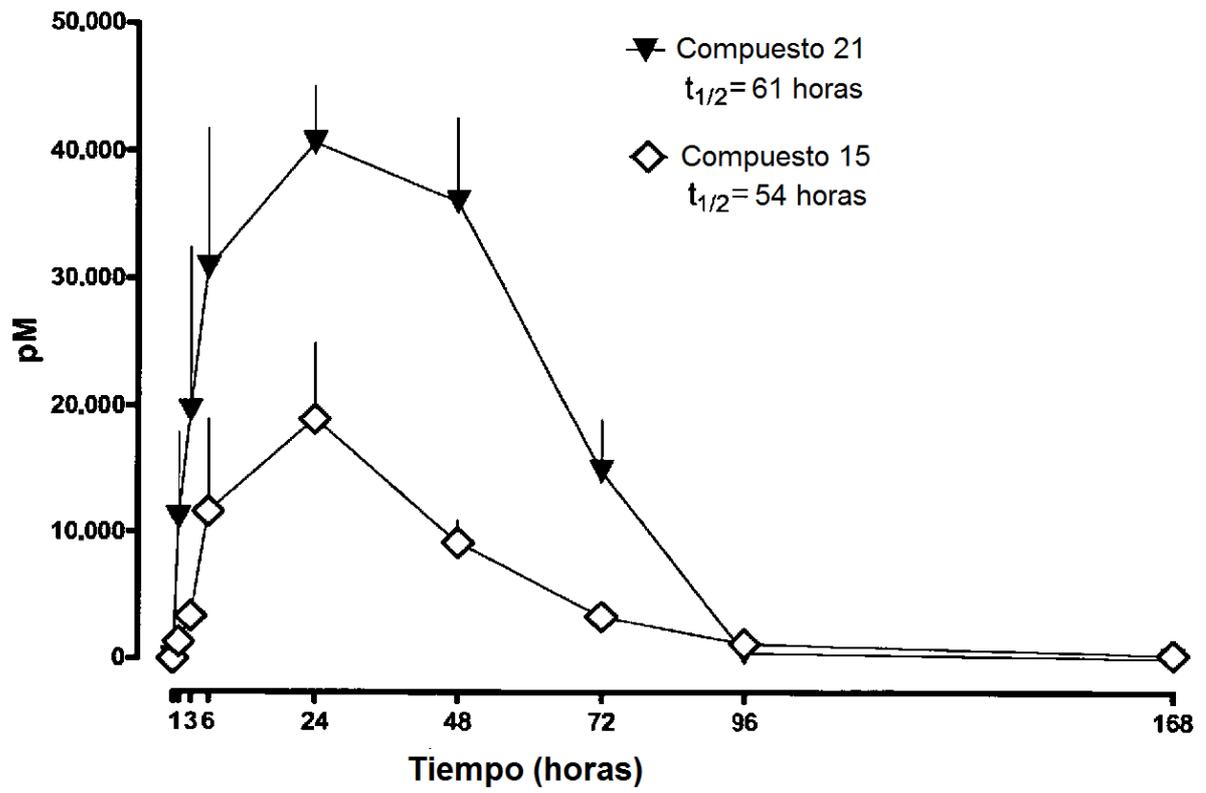


Fig. 13A

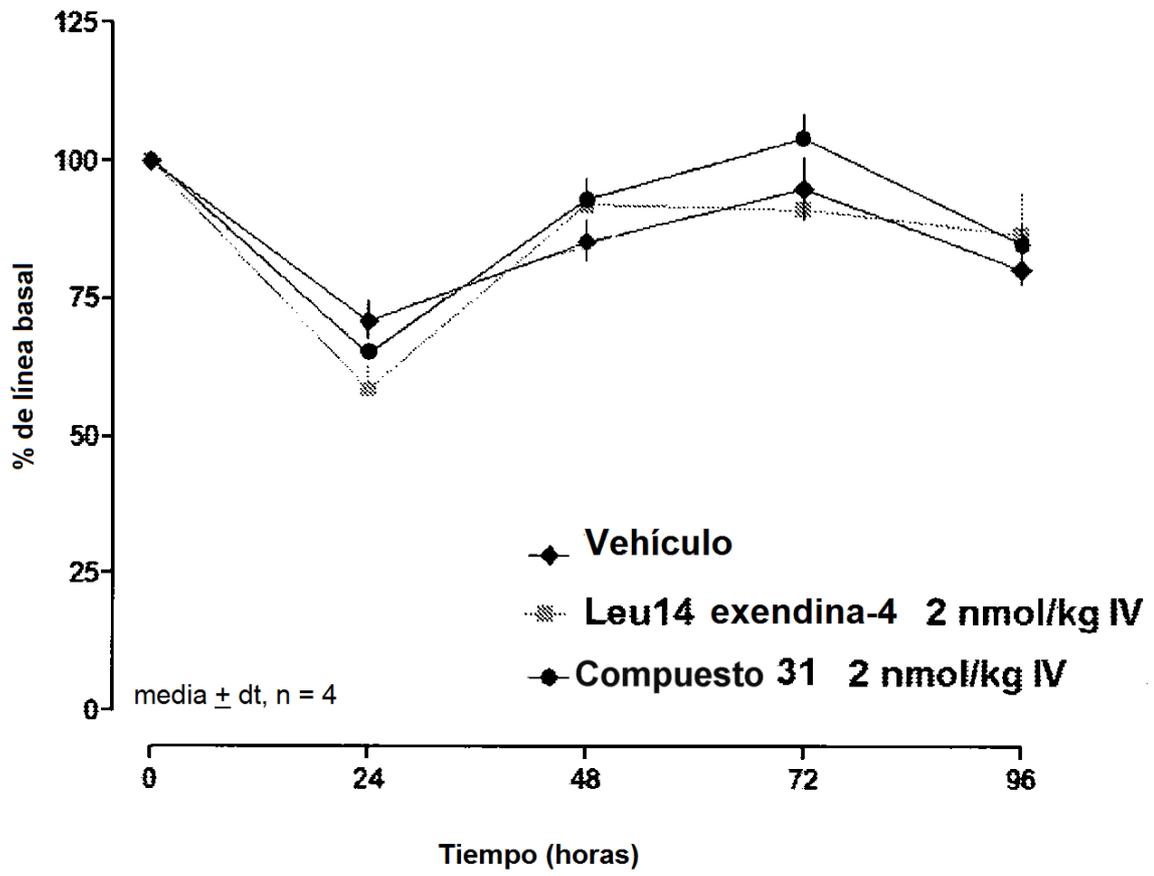


Fig. 13B

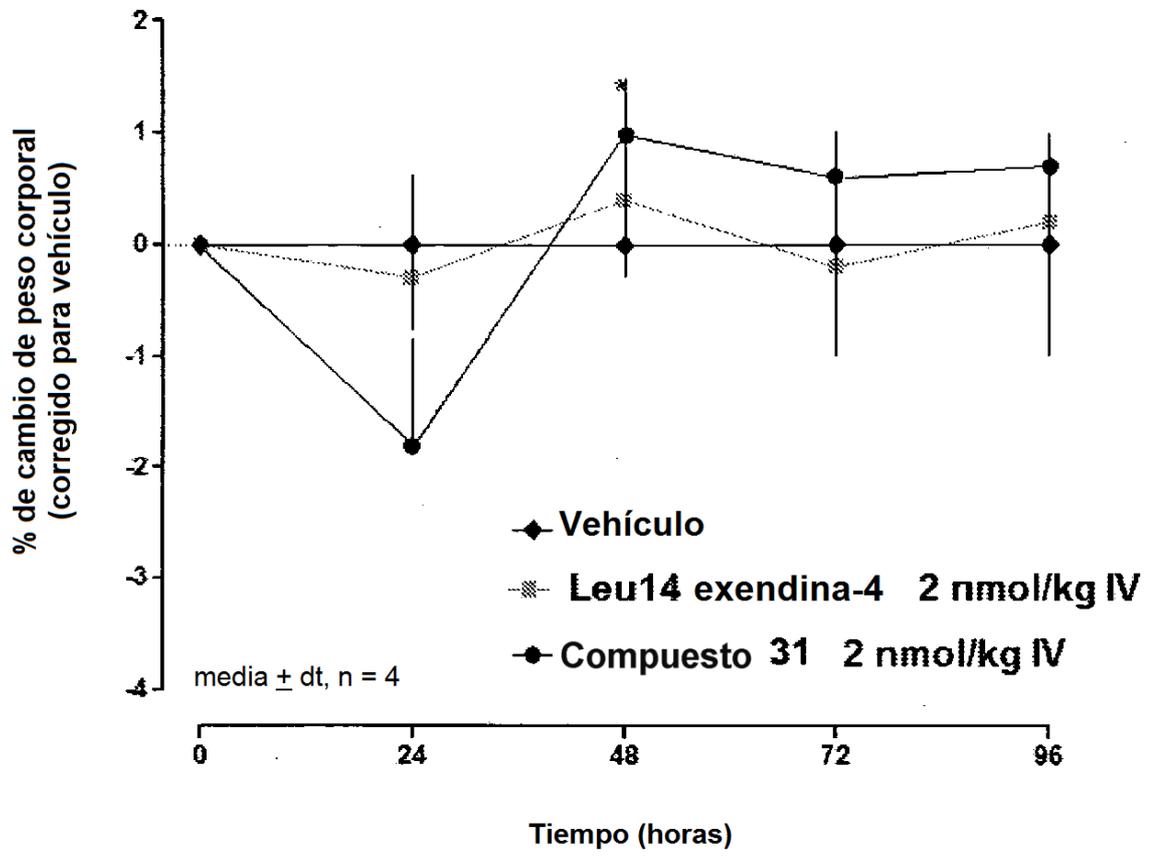


Fig. 13C

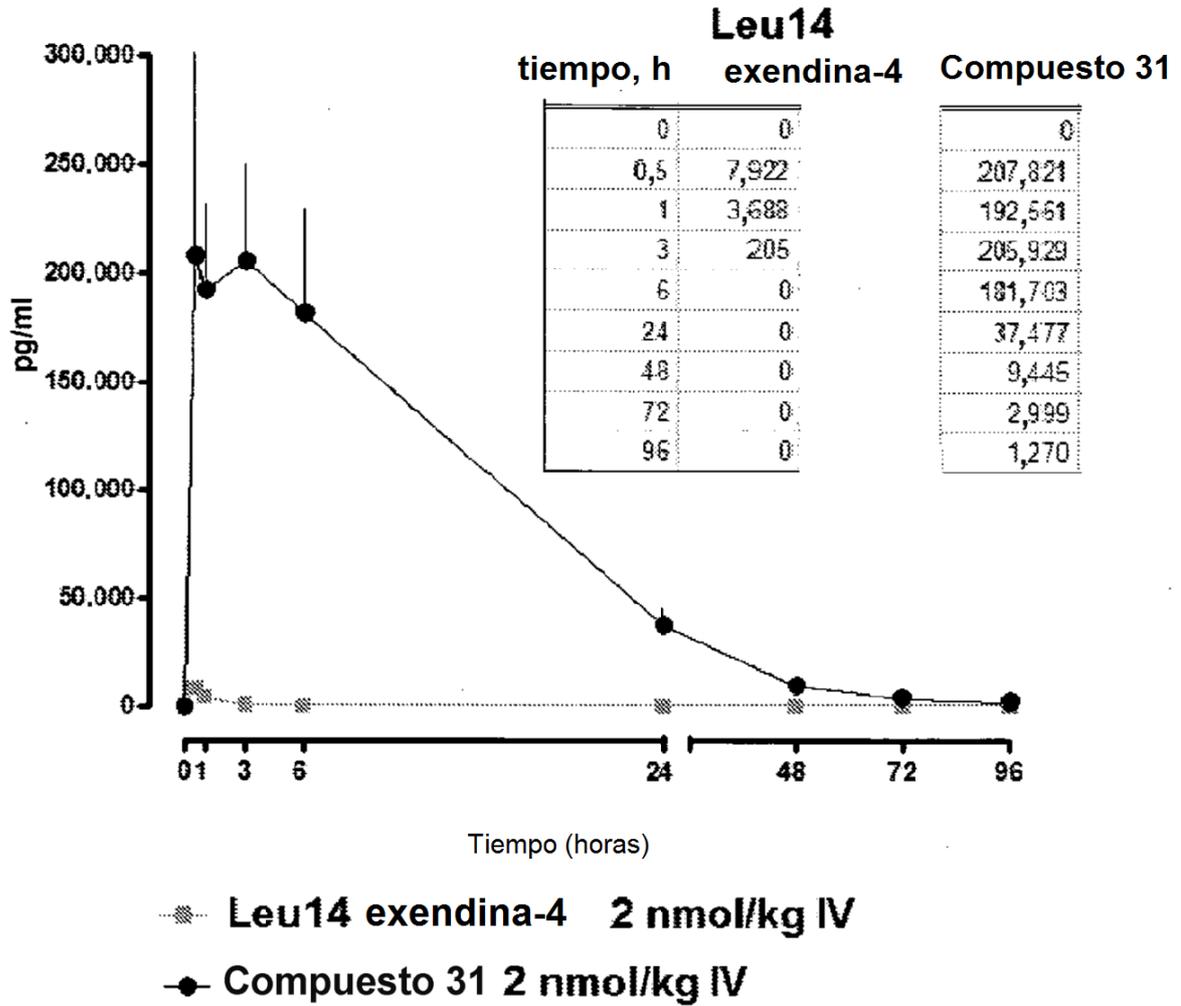


Fig. 14

