

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 962**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2011** **PCT/CN2011/075604**
87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011** **WO11153965**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2011** **E 11791955 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016** **EP 2581389**

54 Título: **Proteína de fusión de exendin-4 y su análogo, método de preparación y uso de la misma**

30 Prioridad:

11.06.2010 CN 201010205166

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2017

73 Titular/es:

BEIJING DONGFANG BIOTECH CO., LTD
(100.0%)
Room 406, Building 1, No. 2 Rongjing East Road,
Beijing Economic-Technical Development Area
Beijing 100176, CN

72 Inventor/es:

BAI, XIANHONG;
TU, HUA y
LI, XIANZHONG

74 Agente/Representante:

GARCÍA PEIRO, Ana Adela

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 597 962 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

Proteína de fusión de exendin-4 y su análogo, método de preparación y uso de la misma.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una proteína de fusión, a un método de preparación y al uso de la misma. Específicamente, la presente invención se refiere a una proteína de fusión de acción prolongada de Exendin-4 y su análogo, secuencia de nucleótido que codifica la proteína de fusión, vectores, células anfitrión y composiciones farmacéuticas, a un método de preparación y al uso de la misma.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 La exendin-4 es una hormona peptídica, que comprende 39 aminoácidos y que está capacitada para estimular secreción de insulina. En 2005, una exenatida inyectable, la Byetta® (una exenatida-4 sintética), la cual había sido desarrollada por las farmacéuticas Eli Lilly y Emily conjuntamente, fue probada para el tratamiento de la diabetes; sin embargo, debido a su pequeño peso molecular, la exenatida-4 es propensa a ser limpiada rápidamente por el riñón y por lo tanto no es capaz de estimular GLP-1R de forma persistente; por lo tanto, solamente se podría conseguir una
- 15 eficacia aceptable mediante dos inyecciones por día, lo que causa muchas inconveniencias para el tratamiento clínico. En consecuencia, el desarrollo de productos farmacéuticos de exendin-4 de acción prolongada podría ayudar a mejorar su eficacia sobre la diabetes de tipo 1 y de tipo 2. Los investigadores farmacéuticos están intentando prolongar la persistencia de la eficacia de los medicamentos que actúan *in vivo* como anti-diabéticos mediante modificación de sus estructuras moleculares.
- 20 Frente al estatus de que la vida media de la GLP-1 o exendin-4 *in vivo* es corta, los investigadores han desarrollado proteínas de fusión correspondientes, tal como la proteína de fusión de GLP-1-albúmina descrita en el documento WO/2002/46227 (también publicada como CN 1483041 A) o el WO/2005/000892 o proteína de fusión de GLP-1-IgG4 (Kim et al., Diabetes. 2003; 52(3); 751-759), y una proteína de fusión obtenida mediante fusión de GLP-1 peptídica similar al glucagón, mutante de GLP-1 con IgG-Fc (CN 1935846 A), pero su actividad ligante *in vitro* es
- 25 relativamente baja y la eficacia de la misma es inferior a la exendin-4. Una invención ideal es aquella que sería capaz de prolongar significativamente la vida media del medicamento *in vivo*, y mantener la eficacia anti-diabética de la exendin-4, así como mejorar la sensibilidad del cuerpo a la insulina; por lo tanto, se anima a las personas para que hagan mayores esfuerzos sobre el desarrollo de factores de acción prolongada de la exendin-4 y su análogo con eficiencia *in vivo* estable.

Sumario de la invención

La presente invención tiene como objetivo proporcionar una proteína de fusión de acción prolongada de exendin-4 y su análogo, con eficacia estable *in vivo*, secuencias de nucleótido correspondientes, vectores, células anfitrión y composiciones farmacéuticas, un método de preparación y el uso de la misma.

- 35 La proteína de fusión de exendin-4 y su análogo en la presente invención, se obtiene fusionando exendin-4 y su análogo con los fragmentos Fc de inmunoglobulina IgG2 mediante enlazador. Esto se usa para el tratamiento de la diabetes y la obesidad, así como en cualesquiera otras enfermedades que pudieran beneficiarse de una bajada del nivel de glucosa en el plasma, la inhibición de la motilidad gastrointestinal y el vaciado gástrico. Debido a sus cortas vidas medias, la exendin-4 y su análogo necesitan ser inyectadas diariamente para mantener la eficacia, por lo que tienen una determinada limitación en la práctica clínica. Con el fin de promover la eficacia terapéutica de este medicamento, la solicitante ha realizado estudios adicionales y ha desarrollado la proteína de fusión de exendin-4 y su análogo en la presente invención. Y esta proteína de fusión tiene una estabilidad más alta y una vida media más
- 40 larga *in vivo*, de modo que podría por lo tanto facilitar la reproducción y la restauración de las células de islote β según el nivel *in vivo* de glucosa, incrementar la cantidad de células de islote β , y por lo tanto fomentar la secreción de insulina y acelerar la sensibilidad del cuerpo a la insulina, y por lo tanto tener un efecto anti-diabético superior y un riesgo hipoglucémico mínimo; además, podría también reducir el peso corporal y puede ejercer también un efecto hipolipemiante e hipotensor, protegiendo de ese modo el sistema cardiovascular, así como mejorando el reposo y la función de memoria al actuar sobre el sistema nervioso central para proteger el sistema nervioso.

- 45 La presente invención proporciona una proteína de fusión, la cual se obtiene fusionando hormona peptídica con proteína de transporte vía enlazador, en donde dicha hormona peptídica es exendin-4 o análogo de exendin-4, y la citada hormona peptídica está capacitada para rebajar la glucosa de la sangre; la proteína de transporte citada es el fragmento FC de la inmunoglobulina IgG2; la citada proteína de fusión está capacitada para rebajar la glucosa de la sangre.
- 50

La proteína de fusión de exendin-4 y su análogo proporcionados en la presente invención, se obtienen por fusión de exendin-4 y su análogo en fragmentos Fc de inmunoglobulina IgG2, a través de un enlazador.

- 55 Como parte de la proteína de fusión, la exendin-4 o su análogo es exendin-4 [SEQ ID Núm. 1], o un derivado de la

misma.

Se debe apreciar que, en la presente invención, debe entenderse que la exendin-4 y su análogo incluyen cualquier derivado de exendin-4, que sea antigénico de DPP-IV o un fragmento del mismo, y que tienen un efecto biológico similar (es decir, efecto hipoglucémico) que sus originales. Los derivados incluyen, aunque sin limitación, sustitución de aminoácido regular, sustitución directa y modificación química de aminoácido, etcétera.

La citada exendin-4 y su análogo podrían ser la secuencia de exendin-4 mostrada por SEQ ID Núm. 1 y sus derivados. En la que, dicho derivado de exendin-4 es un péptido con 6 o menos diferencias con la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 1, con preferencia los péptidos con 5 o menos diferencias con la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 1, y más preferiblemente los péptidos con 4, 3, 2 ó 1 diferencia(s) con la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 1, es decir, existen 6 o menos, con preferencia 5 o menos, más preferiblemente 4 o menos, aún más preferiblemente 3 o menos, incluso más preferiblemente 2 o menos, con mayor preferencia 1 o menos diferencia(s) de sitio de aminoácido entre la citada secuencia derivada de la secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 1 y la secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 1.

La citada exendin-4 y su análogo son preferiblemente exendin-4 que tiene la secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 1.

Es decir, la hormona peptídica citada comprende la secuencia mostrada por la Fórmula I:

His-Xaa²-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa¹⁰-Ser-Xaa¹²-Xaa¹³-Xaa¹⁴-Glu-Glu-Glu-Ala-
Xaa¹⁹-Xaa²⁰-Xaa²¹-Phe-Ile-Xaa²⁴-Trp-Leu-Xaa²⁷-Xaa²⁸-Gly-Xaa³⁰-Xaa³¹-Xaa³²-Xaa³³-Xaa³⁴-
Xaa³⁵-Xaa³⁶-Xaa³⁷-Xaa³⁸-Xaa³⁹ Fórmula I

En la que:

Xaa² puede ser Gly, Thr, Ala, Ser, Leu, Ile o Lys;

Xaa¹⁰ puede ser Leu, Ala, Ser, Leu, Ile, Glu o Lys;

Xaa¹² puede ser Lys, Leu, Thr, Ser, Leu, Ile o Cys;

Xaa¹³ puede ser Gln, Thr, Ala, Val, Leu, Ile o Lys;

Xaa¹⁴ puede ser Met, Tyr, Thr, Ala, Ser, Ile o Lys;

Xaa¹⁹ puede ser Val, Cys, Ala, Ser, Leu, Ile o Lys;

Xaa²⁰ puede ser Arg, Thr, Tyr, Ser, Leu, Ile o Lys;

Xaa²¹ puede ser Leu, Thr, Ala, Asp, Glu, His o Lys;

Xaa²⁴ puede ser Glu, Leu, Thr, Ala, Ser, Lys o Ile;

Xaa²⁷ puede ser Lys, Ala, Ser, Leu, Thr, Ile o Lys;

Xaa²⁸ puede ser Asn, Thr, Ala, Ser, Leu, Ile o Lys;

Xaa³⁰ puede ser Gly, Thr, Ala, Ser, Leu, He o Arg;

Xaa³¹ puede ser Pro, Val, Ser, Ala, Leu, He o Lys;

Xaa³² puede ser Ser, Thr, Glu, Ser, Asp, Lys o Ile;

Xaa³³ puede ser Thr, Ser, Ala, Met, Leu, Ile o Lys;

Xaa³⁴ puede ser Gly, Thr, Met, Ser, Ile, Leu o Lys;

Xaa³⁵ puede ser Ala, Thr, Ala, Glu, Leu, Ile o Phe;

Xaa³⁶ puede ser Pro, Ala, Thr, Ser, Leu, Ile o Cys;

Xaa³⁷ puede ser Pro, Thr, Ser, Ala, His, Lys o Ile;

Xaa³⁸ puede ser Pro, Thr, Val, Ser, Leu, Lys o Ile;

Xaa³⁹ puede ser Ser, Tyr, Ala, Leu, Ser, Ile o Lys.

En donde, el citado enlazador es el péptido que tiene la secuencia mostrada por (Gly)_m-Xaa-(Gly)_n, en la que, m es un número entero entre 3 y 8, n es un número entero entre 3 y 8, Xaa es uno cualquiera seleccionado en el grupo consistente en Gly, Ser, Ala y Thr. La secuencia mostrada por la Fórmula I es la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 23.

En donde, m es preferiblemente un número entero entre 4 y 6, n es preferiblemente un número entero entre 4 y 6.

En donde, el citado enlazador tiene con preferencia la secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 3.

En donde, de manera más preferible, la citada proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 4.

El fragmento FC de IgG2 como parte de la proteína de fusión, es de origen humano.

- 5 La citada igG comprende el fragmento Fc de IgG, o fragmento o derivado de Fc.

La presente invención proporciona también la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína de fusión mencionada con anterioridad.

La presente invención proporciona también el vector que comprende la secuencia de polinucleótido.

- 10 La presente invención proporciona también la célula anfitrión transfectada por el vector según se ha descrito con anterioridad, y la célula anfitrión según se ha descrito puede ser la célula CHO o la célula NS0.

Conforme a la célula anfitrión proporcionada por la presente invención, en donde dicha célula anfitrión se genera mediante transfección de la célula receptora por el vector según se ha descrito con anterioridad.

Conforme a la célula anfitrión proporcionada por la presente invención, en donde la citada célula receptora es la célula CHO.

- 15 Conforme a la célula anfitrión proporcionada por la presente invención, en donde la citada célula receptora es la célula NS0.

La presente divulgación proporciona también un método de preparación de proteína de fusión de exendin-4 y su análogo, que comprende las etapas de transcripción y traducción del citado polinucleótido, así como purificación usando el método de Proteína A.

- 20 Esta divulgación también proporciona un procedimiento de preparación de proteína de fusión según se ha descrito con anterioridad, en donde el procedimiento comprende las siguientes etapas:

(1) transcripción y traducción de la secuencia de polinucleótido según se ha mencionado anteriormente, (2) purificación de los productos de traducción de la secuencia de polinucleótido según se ha mencionado con anterioridad, usando el método de Proteína A.

- 25 Después de que la proteína de fusión de la presente invención se haya expresado en la célula anfitrión, se pueden usar varios métodos de purificación de proteína y que son también muy conocidos en el estado de la técnica, mientras que la elección del método de purificación depende del procedimiento de producción y de la proteína específica producida. Por ejemplo, se puede usar matriz de afinidad de proteína A o de proteína G para la purificación efectiva de la proteína de fusión que incluye el fragmento Fc, y se podría usar tampón de bajo o alto pH para eluir proteína de fusión a partir de la matriz de afinidad.

Los métodos para la caracterización de la proteína de fusión de exendin-4 en la presente divulgación, incluyen: SDS-PAGE, Westernblot, electroforesis de enfoque isoelectrico, cromatografía de permeación de gel, espectrografía de masas de desorción/ionización de matriz asistida por láser (MALDI-TOF), cromatografía líquida – espectrometría de masas (LC – MS).

- 35 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica, que comprende proteína de fusión de exendin-4 y su análogo y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En donde, la composición farmacéutica según se ha descrito comprende la proteína de fusión según se ha descrito con anterioridad y el excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 40 El término “farmacéuticamente aceptable” usado en la presente memoria se define como la molécula y su composición que no causan ningún efecto indeseado, alérgico u otros efectos adversos cuando se administran apropiadamente a un animal y un humano. El “excipiente” usado en la presente memoria deberá ser compatible con la proteína de fusión de la presente invención, es decir, normalmente no reducirá significativamente la eficacia de la composición del medicamento cuando se mezcla con la proteína de fusión.

- 45 La proteína de fusión de la presente invención podría ser formulada con uno o más excipientes. La proteína de fusión de la presente invención podría ser formulada en formulación de solución o en formulación de polvo liofilizado inyectable que pudiera ser reconstituido con un diluyente apropiado.

- 50 La proteína de fusión activa de la presente invención podría ser mezclada con tampón medicinal para ajustar el pH con el fin de proporcionar estabilidad aceptable y pH adecuado para medicación parenteral; se podría añadir uno o más agente(s) antibiótico(s) medicinal(es); se podría añadir una o más solución(es) salina(s) medicinal(es) para ajustar la intensidad o la tensión iónica; se podría añadir uno o más excipiente(s) para justar mejor la isotonicidad, tal como glicerina, etcétera.

En cuanto al excipiente de la formulación, el extensor podría consistir en sacáridos, tales como lactosa, glucosa o sacarosa; almidón, tal como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa de sodio, etil celulosa y metil celulosa; polvo de tragacanto; malta; gelatina; talco; lubricante sólido, tal como ácido esteárico y estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz; poliol, tal como glicol propileno, glicerol, alcohol de sorbitol, alcohol manosa y polietileno glicol; ácido alginico; emulsificante, tal como Tween; agente de secado tal como lauril sulfato de sodio; agente colorante; agente saborizante; estabilizadores; antioxidante; conservante, agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución tampón de fosfato, etc.

La forma de sal medicinal de la proteína de fusión de la presente invención está cubierta por la presente invención.

Ácidos comúnmente utilizados para preparar sal de adición de ácido son los ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, yodato de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácidos orgánicos, tales como ácido paratoluenosulfónico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético, etcétera.

Las sales de adición de álcalis incluyen sales derivadas de bases inorgánicas, tal como amonio, hidróxidos de metal alcalino o alcalino térreo. Los álcalis usados en la preparación de la solución salina en la presente invención incluyen también hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato potásico, etcétera.

La presente invención proporciona también la vía de administración de la citada composición farmacéutica, la cual podría ser administrada como administración local, aerosol o inyección; la citada inyección podría ser administrada mediante inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección intramuscular e inyección intravenosa.

En donde, la citada composición farmacéutica se administra como administración local, aerosol o inyección. La citada inyección se administra mediante inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección intramuscular e inyección intravenosa.

La dosis hipoglucémica efectiva de esta proteína de fusión se basa en muchos factores, los cuales incluyen, aunque sin limitación, el género del sujeto, el peso corporal y la edad, la vía de administración y la biodisponibilidad.

La presente invención proporciona también el uso de la proteína de fusión, según se ha descrito, en la producción de medicamentos contra la diabetes y la obesidad.

La proteína de fusión de la presente invención tiene actividad biológica. La actividad biológica se define como la capacidad *in vivo* de esta proteína de fusión para enlazar y activar el receptor GLP-1 y respuestas de excitación. Las respuestas incluyen, aunque sin limitación, la secreción de insulina, la inhibición de glucagón pancreático, la supresión de apetito, la reducción de peso corporal, incluyendo una sensación de saciedad, la supresión de apoptosis de célula P pancreática, la inducción de proliferación y regeneración de célula P pancreática. El Ejemplo 4(1) proporciona el experimento *in vitro* sobre la capacidad de la proteína de fusión para interactuar con, y activar, los receptores GLP-1 humanos e inducir las células de los islotes para que segreguen insulina. El Ejemplo 4(2) proporciona datos de la actividad hipoglucémica *in vivo* de ratones obesos Ob/ob con diabetes y el modelo de ratón resistente a la insulina.

La proteína de fusión de exendin-4 y su análogo de la presente invención muestran una eficacia anti-diabética importante: mediante el fomento de la producción y restauración de células de islotes β , incrementan la cantidad de células de islotes β , estimulan la secreción de insulina, incrementan la sensibilidad del cuerpo a la insulina, y por lo tanto controlan de manera eficaz el nivel de glucosa en sangre de pacientes con diabetes de tipo 2 e incluso de tipo 1, y consiguen un efecto de tratamiento a largo plazo. La proteína de fusión de la presente invención ejerce su actividad biológica al actuar sobre el receptor "GLP-1", y podría ser usada para el tratamiento de la diabetes y la obesidad.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el resultado de la electroforesis de gel de productos enzimáticos digestados del vector pH112-SP-IgGH/exendin-4/IgG2-Fc;

La Figura 2 muestra el atlas de identificación inmunológica de la proteína de fusión de exendin-4;

La Figura 3 muestra el atlas de electroforesis de enfoque isoelectrico de la proteína de fusión de exendin-4;

La Figura 4 muestra el atlas de cromatografía de gel de la proteína de fusión de exendin-4;

La Figura 5 muestra el resultado de la variación de concentración de cAMP en células CHO-hGLP1R tras haber sido tratadas con proteína de fusión de exendin-4;

La Figura 6 muestra el efecto hipoglucémico de una inyección única de proteína de fusión de exendin-4 en un modelo de ratón KK-Ay diabético obeso;

La Figura 7 muestra el resultado de tolerancia oral de la proteína de fusión de exendin-4 en el modelo de ratón KK-Ay diabético obeso;

La Figura 8 muestra la influencia de la administración de proteína de fusión de exendin-4 de largo plazo sobre la glucosa en sangre en el modelo de ratón KK-Ay diabético obeso;

- 5 La Figura 9 muestra la influencia de la administración de proteína de fusión de exendin-4 de largo plazo sobre la toma de alimento del ratón;

La Figura 10 muestra la influencia de la administración de proteína de fusión de exendin-4 de largo plazo sobre el peso corporal del ratón;

- 10 La Figura 11 muestra el resultado de tolerancia a la glucosa oral dentro de las 24 horas siguientes a la administración del tratamiento de proteína de fusión de exendin-4 de largo plazo;

La Figura 12 muestra el resultado de tolerancia a la glucosa oral dentro de las 48 horas siguientes a la administración del tratamiento de proteína de fusión de exendin-4 de largo plazo;

La Figura 13 muestra la influencia de la proteína de fusión de exendin-4 sobre la glucosa en sangre del modelo de ratón db/db diabético obeso.

15 Descripción detallada de ejemplos de realización

El modo de realización de la presente invención va a ser descrito con los ejemplos que siguen. Sin embargo, debe apreciarse que la realización no se limita a determinados detalles de esos ejemplos, puesto que otras variaciones son bien conocidas o resultan obvias en base al contenido directamente divulgado y a las reivindicaciones anexas para los expertos en la materia. Por lo tanto, cualquier tecnología desarrollada conforme al contenido que antecede de la presente invención cae dentro del alcance de la presente invención. Las referencias citadas en la presente memoria se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Los métodos experimentales descritos en los ejemplos que siguen son todos ellos tecnologías habituales a menos que se especifique otra cosa; los reactivos y productos biológicos descritos están todos comercialmente disponibles a menos que se especifique lo contrario.

25 Ejemplo 1. Síntesis de construcción de vector y gen de expresión de proteína de fusión de exendin-4

La construcción de ADN de proteína de fusión de exendin-4 se logra mediante síntesis de gen por reacción de cadena de ligasa, y su secuencia de proteína comprende lo siguiente:

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGAGGGGVECPPCPAPPV
 AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 30 EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT
 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*[SEQ ID Núm. 4]

- 35 En donde, en la secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 4, la hormona peptídica consiste en los aminoácidos 1-39, es decir, la exendin-4, y posee la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 1; el enlazador consiste en los aminoácidos 40-48 y tiene la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 3 (en donde Xaa es Ala); la proteína de transporte consiste en los aminoácidos 49-271, es decir, el fragmento Fc de IgG2.

En primer lugar, se construye el vector que codifica la exendin-4 y la proteína de fusión de IgG2-Fc humana para esta proteína de fusión. El dominio IgG2 comprende la parte CH2 y CH3 de la cadena pesada constante de IgG2.

- 40 La secuencia peptídica líder SP-IgCH de IgG se fusiona con exendin-4 con el fin de guiar la proteína de fusión sintetizada hacia el medio de cultivo mediante secreción. El cADN que codifica la proteína de fusión SP-IgGH/Exendin-4/IgG2 (la secuencia de aminoácido para el enlazador existe entre exendin-4 e IgG2) se sintetiza mediante un sintetizador automático de PCR y ADN, y se inserta entre el sitio *Hind* III y *Not* I del vector pHT112 (adquirido en Yihu Biopharmaceutical Cio., Ltd.) con el fin de construir el vector pHT112-SP-IgGH/Exensina-4/IgG2-Fc con capacidad de secreción que comprende la cadena pesada constante de IgG2 (CH2 y CH3). La secuencia peptídica de conducción de secreción de SP-IgGH se fusiona con la secuencia de exendin-4 con el fin de inducir la secreción de la proteína sintetizada en la solución nutriente de la célula. La Figura 1 muestra el resultado del vector pHT112-SP-IgGH/Exendin-4/IgG2 reflejado en electroforesis de gel de agarosa tras la digestión por un par de endonucleasas, *Hind* III y *Not* I. Las endonucleasas, *Hind* III y *Not* I, suprimen 880 pares de bases del inserto de ADN, incluyendo el SP-IgGH/Exendin-4/IgG2-Fc.

Ejemplo 2. Construcción, expresión y purificación de línea celular de diseño para proteína de fusión de exendin-4.

1. Construcción de línea celular de diseño para proteína de fusión de exendin-4.

Se cultivaron células de ovario de hámster chino (CHO) en solución de cultivo completa DMEM (adquirida en Invitrogen) con un 10% (porcentaje en volumen) de suero fetal de ternero (FCS), y se difundieron sobre una placa de 6 pocillos un día antes de la transfección con 3×10^5 células por pocillo. Para la transfección, se hace referencia a la instrucción LIPOFECTAMINE 2000. Transcurridas 48 horas desde la transfección, las células se cultivaron comprimadamente en substrato selectivo (25 μ M de metionina sulfoximina (MSX) 25 μ M) durante aproximadamente una semana, a continuación se vaciaron todas células que estaban muertas, y las células supervivientes fueron inoculadas en placas de 96 pocillos (50 células/pocillo) para cultivo de compresión adicional. Después de que las células fueron clonadas, se usó el ensayo ELISA para determinar la cantidad de expresión de proteína en aparte sobrenadante del cultivo, y los pocillos con expresión alta (la cantidad de expresión excede 200 mg/l) fueron seleccionados y transfectados en placas de 24 pocillos para cultivo de amplificación. Se llevó a cabo de nuevo ELISA para determinar la expresión de proteína en el sobrenadante, y conforme a la referencia (Manual Experimental Celular, Science Press, 2003), se seleccionaron líneas celulares con alta expresión (cantidad de expresión superior a 200 mg/l) y continuó el cultivo de amplificación, y mediante cultivo de suspensión doméstico gradual, se estableció el banco de células semilla y se llevó a cabo subclonación con el fin de establecer un banco de células de trabajo (línea de células de diseño de compuesto de CHO).

2. Purificación de proteína de fusión de exendin-4

La línea de células de diseño de CHO obtenida con anterioridad, se descongeló e inoculó en un frasco T de 25 cm², cada uno con 5 ml de suspensión celular, y tras agitar el cultivo durante 4-5 días, el contenido se amplificó en un frasco triangular y se cultivó adicionalmente durante 7-10 días, conforme al procedimiento de la referencia (Clonación Molecular, Science Press, 2002), se separó el fluido del cultivo celular con proteína de fusión y se purificó secuencialmente con medios de cromatografía de afinidad de Proteína A (MabSure™, compañía GE), medios de cromatografía aniónica (Q Sepherose FF, compañía GE), medios de cromatografía catiónica (SP Sepherose FF, compañía GE), y a continuación se obtuvo proteína de fusión purificada mediante sustitución en tampón de formulación por columna de filtración de gel G-25.

Ejemplo 3. Análisis sobre la estructura de la proteína de fusión de exendin-4

1.- Ensayo Western Blot

Después de que la proteína de fusión purificada se sometió a electroforesis no reductora, se transfirió la banda electroforética sobre membrana de PVDF activada con metanol mediante un dispositivo de transferencia (compañía GE) (corriente: 25 mA, tiempo: 2 h). La membrana de PVDF fue sellada en un 5% en peso de leche desnatada durante 2 h, a continuación se incubó en anticuerpo anti IgG2 pre-diluido etiquetado mediante adición de fosfatasa alcalina durante 1 h, y se lavó con TBST, el cual se reemplazó con producto nuevo cada 5 minutos durante el lavado, y una vez que el lavado estuvo completo, se añadió substrato de ensayo de luminiscencia CDP-star y la película se prensó para exposición y formación de imágenes. El resultado se ha mostrado en la Figura 2, y la proteína de fusión muestra positivo para el anticuerpo de IgG2.

2. Ensayo de electroforesis de enfoque isoeléctrico

Se ensayó la proteína de fusión purificada mediante electroforesis de enfoque isoeléctrico con un sistema de electroforesis rápida (Sistema Phast, GE), para el que se usó gel previamente preparado con pH 3-10, y cuando se realizó electroforesis de enfoque isoeléctrico, se manchó el gel previamente preparado con solución Coomasiie. El resultado ha sido mostrado en la Figura 3. El punto isoeléctrico en la banda principal de proteína de fusión es 5,8, el cual está próximo al valor esperado de 6,2.

3. Purificación de ensayo de cromatografía de gel

La proteína de fusión purificada se analiza mediante cromatografía de gel (columna de cromatografía TSK3000sw) conforme al procedimiento de la referencia (Clonación Molecular, Science Press, 2002), con una cantidad de carga de 10 μ g. El resultado ha sido mostrado en la Figura 4, donde la proteína de fusión se muestra como un pico único, simétrico en la cromatografía de gel, y el tiempo de retención es de 8,5 min.

Ejemplo 4. Bioactividad de la proteína de fusión de exendin-41.- Actividad *in vitro* de la proteína de fusión de exendin-4

A. Prueba de secreción de cAMP de la proteína de fusión de exendin-4 sobre células CHO de receptor GLP-1 humano

La prueba de nivel celular sobre la bioactividad de la proteína de fusión se realiza con células CHO-hGLPIR que

expresan receptor de GLP-1 (según se ha descrito en la referencia WO/2007/017892), para determinar la concentración molar del producto de efecto corriente abajo (el segundo cAMP mensajero) y el rendimiento *in vitro* de la LAX09 de la presente invención (es decir, la proteína de fusión de exendin-4 obtenida según se ha descrito con anterioridad y mostrada por SEQ ID Núm. 4, como en lo que sigue). Se añadió sustrato de DMEM que contenía el 10% en volumen de FBS en una placa de 96 pocillos transparentes negros, y exendin-4 y LAX09 con una concentración de medicamento de 0,01 nM a 1000 nM en sustrato, respectivamente; tras incubación durante 30 minutos, la célula se desintegró y se comprobó la concentración de cAMP intracelular mediante un kit comercial (Cisbio), cuyo resultado se ha mostrado en la Tabla 1.

Tabla 1. Prueba de relación de concentración de cAMP en células que expresan el receptor de GLP-1 humano

Concentración de medicamento (nM)		0,01	0,1	1	10	100	1000
Concentración de cAMP	Exendin-4	2	5	48	135	155	140
	LAX09	2	5	31	115	155	153

El EC₅₀ de LAX09 es aproximadamente 4,5 nM, y el EC₅₀ de exendin-4 es aproximadamente 2,5 nM; los dos casos son cercanos. Por lo tanto, la LAX09 en la presente invención podría producir un nivel de activación de receptor de GLP-1 similar a la exendin-4. Según se ha mostrado en la Figura 5.

B. Prueba de combinación de LAX09 con línea de células de diseño de CHO que expresan GLP-1 R humano

Se llevó a cabo una prueba sobre la combinación de la actividad de LAX09 con la línea de células de diseño de CHO (CHO-hGLPIR, como en lo que sigue) que podía expresar persistentemente el receptor de GLP-1 humano, para determinar la bioactividad de la muestra purificada de la LAX09 de la invención.

Prueba de combinación de la línea celular de CHO-hGLP1R: Se realizó una cepa de diseño de CHO que expresa establemente el GLP-1R humano en suspensión de células individuales, y se ajustó la densidad celular a 10.000.000 células/ml mediante PBS; la muestra de LAX09 se diluyó según un gradiente de concentración diferente. En cada viral se mezclaron 20 µl de suspensión celular con muestras de 20 µl con diferentes concentraciones respectivamente, y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Tras lavado con PBS, se añadieron anticuerpos de cadena γ de inmunoglobulina humana etiquetados con fluoresceína FITC, y se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Después del lavado con PBS, se añadió el 1% de paraformaldehído en PBS, se mezcló uniformemente y se cargó la muestra, se leyó la intensidad de fluorescencia media de la muestra de cada concentración en la zona seleccionada en la citometría de flujo. Según se ha mostrado en la Tabla 2.

Tabla 2. Prueba sobre combinación de actividad de LAX09 con células que expresan receptor de GLP-1 humano

Concentración de masa de LAX09 (µg/ml)	0	0,098	0,246	0,614	1,536	3,84	9,6	24	60
Intensidad de fluorescencia media	10,19	14,12	17,53	21,78	38,01	57,03	81,54	94,81	121,98

2. Actividad *in vivo* de la proteína de fusión de exendin-4

A. Modelo diabético obeso de ratón KK-Ay

Prueba hipoglucémica de inyección única: Los ratones modelo diabético KK-Ay (adquiridos en Beijing HFK Bioscience Co., Ltd., igual que en lo que sigue), fueron aleatorizados en 4 grupos que incluían un grupo de control de PBS y tres grupos experimentales de diferentes gradientes de proteína de fusión de exendin-4 (LAX 09). Tras ayunar durante 2 h, los animales fueron inyectados con el medicamento a través de la vena caudal, con un volumen de 200 µl/animal, a continuación se determinó la glucosa en sangre de los ratones a los 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min y 240 min, habiéndose mostrado el resultado en la Figura 6. La LAX09 tuvo el mejor efecto hipoglucémico a razón de 1 mg/kg, siendo controlada la glucosa en sangre del ratón bajo 10 mmol/l.

Prueba de tolerancia oral a la glucosa: Los ratones modelo diabético KK-Ay fueron aleatorizados en 4 grupos, que incluían un grupo de control de PBS y tres grupos experimentales de diferentes gradientes de proteína de fusión (LAX 09) de exendin-4. Tras un ayuno de 16 h, los animales fueron inyectados con el medicamento subcutáneamente, con un volumen de 200 µl/animal; 6 h más tarde, se administró glucosa a través del tubo gástrico de acuerdo con su peso corporal (1 mg/g), y a continuación se determinó la glucosa en sangre de los ratones a los 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min y 240 min, habiéndose mostrado el resultado en la Figura 7; los ratones del grupo de 1 mg/kg y del grupo de 0,1 mg/kg tienen la misma buena capacidad de mantener la glucosa en sangre normal.

Experimento de administración de larga duración: Los ratones modelo diabético KK-Ay fueron aleatorizados en 2 grupos, que incluían un grupo de PBS y un grupo experimental de 1 mg/kg de proteína de fusión (LAX 09) de exendin-4. El medicamento se administró dos veces por semana, y los ratones se hicieron ayunar durante 6 horas cada miércoles y fueron testados en cuanto a glucosa rápida en sangre, mientras que se registró su toma de alimento y su variación de peso.

El resultado ha sido mostrado en la Figura 8; la glucosa rápida en sangre de los ratones del grupo experimental es significativamente diferente a la del grupo de PBS; la toma de alimento se rebajó, según se muestra en la Figura 9, y el peso se redujo significativamente según se muestra en la Figura 10. Transcurridas 24 horas desde la medicación, el resultado de la prueba de tolerancia oral a la glucosa ha sido mostrado en la Figura 11. Transcurridas 49 horas después de la medicación, el resultado de la prueba de tolerancia oral a la glucosa ha sido mostrado en la Figura 12. Todos estos resultados demuestran una eficacia significativa de la proteína de fusión de exendin-4.

B. Modelo diabético obeso de ratón db-db

Prueba hipoglucémica de inyección única: ratones del modelo diabético db/db con una edad de 5-6 semanas fueron aleatorizados en 4 grupos, que incluían un grupo de control de PBS y tres grupos experimentales de diferentes gradientes de proteína de fusión (LAX 09) de exendin-4. Tras ayudar durante 2 h, los animales fueron inyectados con el medicamento a través de la vena caudal, con un volumen de 200 µl/animal, y a continuación se determinó la glucosa en sangre de los ratones a los 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min y 240 min, habiéndose mostrado el resultado en la Figura 13; el grupo de 1 mg/kg y el grupo de 0,1 mg/kg tuvieron el mejor efecto hipoglucémico.

Ejemplo 5

Conforme al procedimiento de muestra usado en los ejemplos 1-4, se preparó y se determinó la eficacia *in vivo* e *in vitro* de la proteína de fusión según la Tabla 3.

Tabla 3. Proteína de fusión y su bioactividad relativa

Secuencia de la proteína de fusión	Secuencia de la hormona peptídica	Secuencia del péptido enlazador	Secuencia de proteína de transporte	Bioactividad relativa* (%)
SEQ ID Núm. 5	SEQ ID Núm. 6	SEQ ID Núm. 3	IgG2-Fc	99
SEQ ID Núm. 7	SEQ ID Núm. 8	SEQ ID Núm. 3	IgG2-Fc	98
SEQ ID Núm. 9	SEQ ID Núm. 10	SEQ ID Núm. 3	IgG2-Fc	97
SEQ ID Núm. 11	SEQ ID Núm. 12	SEQ ID Núm. 3	IgG2-Fc	96
SEQ ID Núm. 13	SEQ ID Núm. 14	SEQ ID Núm. 3	IgG2-Fc	95
SEQ ID Núm. 15	SEQ ID Núm. 16	SEQ ID Núm. 3	IgG2-Fc	94
SEQ ID Núm. 17	SEQ ID Núm. 18	SEQ ID Núm. 3	IgG2-Fc	93
SEQ ID Núm. 19	SEQ ID Núm. 20	SEQ ID Núm. 3	IgG2-Fc	92
SEQ ID Núm. 21	SEQ ID Núm. 2	SEQ ID Núm. 3	IgG2-Fc	91
SEQ ID Núm. 22	SEQ ID Núm. 1	SEQ ID Núm. 3	IgG4-Fc	75
* La bioactividad relativa se define como la relación relativa entre la reducción de glucosa rápida en sangre (en comparación con el grupo de control del ensayo) de la proteína de fusión determinada mediante experimento de administración prolongada (ratón modelo diabético KK-Ay) entre el modelo diabético obeso de ratón KK-Ay y el valor correspondiente de la proteína de fusión purificada obtenida en el ejemplo 2.				

Específicamente, la administración de largo plazo se realiza conforme al protocolo siguiente: los ratones modelo diabético KK-Ay son aleatorizados en un grupo de control de ensayo (inyectados solamente con PBS) y el grupo experimental (inyectados con 1 mg/kg de la proteína de fusión de la Tabla 3). El medicamento se administra dos veces por semana; después de 2 semanas, los ratones se hicieron ayunar durante 6 h y se comprobaron en cuanto a glucosa en sangre en ayunas, y se calculó el descenso de la glucosa en sangre de un grupo experimental restando la glucosa en sangre en ayunas del grupo experimental de la del grupo de control de ensayo.

En donde, SEQ ID Núm. 6 es diferente de los sitios de aminoácido de SEQ ID Núm. 1 y 2, y tiene la secuencia de fórmula I; SEQ ID Núm. 8 es diferente de SEQ ID Núm. 1 en 3 sitios de aminoácido, y tiene la secuencia de fórmula I; SEQ ID Núm. 10 es diferente de SEQ ID Núm. 1 en 4 sitios de aminoácido, y tiene la secuencia de fórmula I; SEQ ID Núm. 14 es la secuencia de aminoácido de GLP-1A8G; SEQ ID Núm. 16 es diferente de SEQ ID Núm. 2 en 3 sitios de aminoácido; SEQ ID Núm. 18 es diferente de SEQ ID Núm. 2 en 3 sitios de aminoácido; SEQ ID Núm. 20

es diferente de SEQ ID Núm. 2 en 2 sitios de aminoácido: Las secuencias 13, 15, 17, 19 y 21 no caen dentro de la invención.

Los resultados descritos en lo que antecede muestran que la proteína de fusión proporcionada en la presente invención es eficaz para rebajar la glucosa en sangre, y cuando la hormona peptídica es la secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 1 y la proteína de transporte es IgG2, podría prolongar significativamente la vida media *in vivo* del medicamento y también mantener la eficacia hipoglucémica de la exendin-4, así como incrementar la sensibilidad del cuerpo a la insulina. Pero cuando la proteína de transporte es IgG4-Fc, la bioactividad relativa de la proteína de fusión es más baja.

Listado de secuencias

- 10 <110> BEIJING DONGFANG BIOTECH CO., LTD.
 <120> Proteína de fusión de exendin-4 y su análogo, método de preparación y uso de la misma
 <130> P6042739PCT/EP
 <150> CN 201010205166.9
 <151> 2010-06-11
- 15 <160> 23
 <170> Patentin versión 3.2
 <210> 1
 <211> 39
 <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
 <400> 1
 His Gly Glu7 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
 25 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser 35
- 30 <210> 2
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 2
 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
 35 20 25 30
- 40 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5) ... (5)
 <223> Xaa=Gly; Ser; Ala o Thr
 <400> 3
 Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 4
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) ... (39)
 <223> la hormona peptídica es los aminoácidos 1-39, es decir, exendin-4 y posee la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 1

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40) ... (48)
 <223> el enlazador es los aminoácidos 40-48 y la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 3 (en donde Xaa es Ala)

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49) ... (271)
 <223> la proteína de transporte es los aminoácidos 49-271, es decir, el fragmento Fc de IgG2
 <400> 4

20

25

30

35

40

```

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 Gly Ala Gly Gly Gly Gly
      35      40      45
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
      50      55      60
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
65      70      75      80
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
      85      90      95
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
      100      105      110
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
      115      120      125

```

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
130 135 140

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
145 150 155 160

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
165 170 175

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
180 185 190

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
195 200 205

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
210 215 220

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
225 230 235 240

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
245 250 255

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265 270

<210> 5

<211> 271

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 5

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

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

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
50 55 60

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
65 70 75 80

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
85 90 95

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
100 105 110

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
115 120 125

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
130 135 140

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
145 150 155 160

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
165 170 175

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
180 185 190

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
195 200 205

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
210 215 220

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
225 230 235 240

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
245 250 255

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265 270

<210> 6

<211> 39

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) ... (39)

10 <223> diferente de SEQ ID Núm. 1 en 2 aminoácidos

<400> 6

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 7

<211> 271

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 7

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

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

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
50 55 60

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
65 70 75 80

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
85 90 95

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
100 105 110

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
115 120 125

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
130 135 140

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
145 150 155 160

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
165 170 175

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
180 185 190

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
195 200 205

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
210 215 220

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
225 230 235 240

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
245 250 255

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265 270

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> NISC_FEATURE

<222> (1) ... (39)

<223> diferente de SEQ ID Núm. 1 en 3 sitios de aminoácido

10 <400> 8

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 9

<211> 271

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 9

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

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

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
50 55 60

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
65 70 75 80

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
85 90 95

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
100 105 110

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
115 120 125

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
130 135 140

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
145 150 155 160

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
165 170 175

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
180 185 190

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
195 200 205

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
210 215 220

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
225 230 235 240

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
245 250 255

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265 270

<210> 10
<211> 39

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE

5 <222> (1) ... (39)
<223> diferente de SEQ ID Núm. 1 en 4 sitios de aminoácido

<400> 10

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

10 <210> 11
<211> 271
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 11

15

ES 2 597 962 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Leu Thr Tyr Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Cys Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asp Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly
 35 40 45
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 50 55 60
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 65 70 75 80
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 85 90 95
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 100 105 110
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 115 120 125
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

130		135		140
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile				
145		150	155	160
Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro				
	165		170	175
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu				
	180	185		190
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn				
	195	200	205	
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser				
	210	215	220	
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg				
225	230	235		240
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu				
	245	250		255
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
	260	265		270

<210> 12
 <211> 39
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) ... (39)
 <223> diferente de SEQ ID Núm. 1 en 6 sitios de aminoácido

10 <400> 12

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Leu Thr Tyr Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Cys Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asp Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

15 <210> 13
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 13

Ala Ala Glu Gly Thr Phe Thr Gly 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 Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 35 40 45
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 50 55 60
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 65 70 75 80
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 85 90 95
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 100 105 110
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 115 120 125
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 130 135 140
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 165 170 175
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 180 185 190
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 195 200 205
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 210 215 220
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 225 230 235 240

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
245 250 255

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260

<210> 14
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) ... (31)

<223> secuencia de aminoácido de GLP-1A8G

<400> 14

Ala Ala Glu Gly Thr Phe Thr Gly 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> 15
<211> 262
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 15

His Thr Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
35 40 45

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
50 55 60

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
65 70 75 80

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
85 90 95

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
100 105 110

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
115 120 125

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
130 135 140

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
145 150 155 160

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
165 170 175

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
180 185 190

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
195 200 205

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
210 215 220

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
225 230 235 240

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
245 250 255

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) ... (31)

<223> diferente de SEQ ID Núm. 2 en 3 sitios de aminoácido

10 <400> 16

His Thr Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

<210> 17

<211> 262

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 17

His	Thr	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly	1	5	10	15
Gln	Ala	Ser	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	Gly	20	25	30	
Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	35	40	45	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	50	55	60	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	65	70	75	80
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	85	90	95	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	100	105	110	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	115	120	125	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	130	135	140	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	145	150	155	160
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	165	170	175	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	180	185	190	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	195	200	205	
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	210	215	220	

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
225 230 235 240

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
245 250 255

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260

<210> 18

<211> 262

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) ... (30)

<223> diferente de SEQ ID Núm. 2 en 3 sitios de aminoácido

10 <400> 18

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

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

<210> 19

<211> 262

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<400> 19

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
35 40 45

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
50 55 60

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
65 70 75 80

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
85 90 95

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
100 105 110

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
115 120 125

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
130 135 140

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
145 150 155 160

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
165 170 175

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
180 185 190

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
195 200 205

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
210 215 220

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
225 230 235 240

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
245 250 255

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) ... (30)

<223> diferente de SEQ ID Núm. 2 en 2 sitios de aminoácido

10 <400> 20

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

<210> 21
<211> 262
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <400> 21

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 Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 35 40 45
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 50 55 60
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 65 70 75 80
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 85 90 95
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 100 105 110
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 115 120 125
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 130 135 140
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 145 150 155 160
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 165 170 175
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 180 185 190
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 195 200 205
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

```

210                215                220
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
225                230                235                240

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
                245                250                255

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                260

```

- 5 <210> 22
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) ... (39)
 <223> la hormona peptídica es los aminoácidos 1-39, es decir, exendin-4, y posee la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 1
- 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40) ... (48)
 <223> el enlazador es los aminoácidos 40-48 y tiene la secuencia mostrada por SEQ ID Núm. 3 (en donde Xaa es Ala)
- 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49) ... (278)
 <223> la proteína de transporte es los aminoácidos 49-271, es decir, el fragmento Fc de IgG4, igual que en WO/2005/000892
- <400> 22

```

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 Asp Gly Gly Pro Ser
                20                25                30

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

Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
                50                55                60

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
65                70                75                80

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
                85                90                95

```

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
100 105 110

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
115 120 125

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
130 135 140

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
145 150 155 160

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
165 170 175

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
180 185 190

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
195 200 205

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
210 215 220

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
225 230 235 240

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
245 250 255

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
260 265 270

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
275

<210> 23
<211> 39
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) ... (2)
10 <223> Xaa=Gly£-Thr£-Ala£-Ser£-Leu£-Ile o Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10) ... (10)
<223> Xaa=Leu£-Ala£-Ser£-Leu£-Ile£-Glu o Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12) ... (12)
 <223> Xaa=Lys£-Leu£-Thr£-Ser£-Leu£-Ile o Cys

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13) ... (13)
 <223> Xaa=Gln£-Thr£-Ala£-Val£-Leu£-Ile o Lys

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14) ... (14)
 <223> Xaa=Met£-Try£-Thr£-Ala£-Ser£-Ile o Lys

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19) ... (19)
 <223> Xaa=Val£-Cys£-Ala£-Ser£-Leu£-Ile o Lys

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20) ... (20)
 <223> Xaa=Arg£-Thr£-Tyr£-Ser£-Leu£-Ile o Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21) ... (21)
 <223> Xaa=Leu£-Thr£-Ala£-Asp£-Glu£-His o Lys

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29) ... (29)
 <223> Xaa=Glu£-Leu£-Thr£-Ala£-Ser£-Lys o Ile

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27) ... (27)
 <223> Xaa=Lys£-Ala£-Ser£-Leu£-Thr£-Ile o Lys

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29) ... (28)
 <223> Xaa=Asp£-Thr£-Ala£-Ser£-Leu£-Ile o Lys

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30) ... (30)
 <223> Xaa=Gly£-Thr£-Ala£-Ser£-Leu£-Ile o Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31) ... (31)
 <223> Xaa=Pro£-Val£-Ser£-Ala£-Leu£-Ile o Lys

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32) ... (32)

<223> Xaa=Ser£-Thr£-Glu£-Ser£-Asp£-Lys o Ile
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33) ... (33)
 5 <223> Xaa=Thr£-Ser£-Ala£-Met£-Leu£-Ile o Lys
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34) ... (34)
 <223> Xaa=Gly£-Thr£-Met£-Ser£-Ile£-Leu o Lys
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35) ... (35)
 <223> Xaa=Ala£-Thr£-Ala£-Glu£-Leu£-Ile o Phe
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (36) ... (36)
 <223> Xaa=Pro£-Ala£-Thr£-Ser£-Leu£-Ile o Cys
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (37) ... (37)
 <223> Xaa=Pro£-Thr£-Ser£-Ala£-His£-Lys o Ile
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38) ... (38)
 25 <223> Xaa=Pro£-Thr£-Val£-Ser£-Leu£-Lys o Ile
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39) ... (39)
 <223> Xaa=Ser£-Tyr£-Ala£-Leu£-Ser£-Ile o Lys
 30 <400> 23

His	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Ile	Xaa	Trp	Leu	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa								
			35												

35

40

REIVINDICACIONES

- 1.- Una proteína de fusión, que se obtiene por fusión de una hormona peptídica con una proteína de transporte a través de un enlazador, en donde la hormona peptídica es exendin-4 o el análogo de exendin-4, y la hormona peptídica está capacitada para rebajar la glucosa en sangre; la proteína de transporte es el fragmento Fc de la inmunoglobulina IgG2; la proteína de fusión está capacitada para rebajar la glucosa en sangre; el análogo de exendin-4 es un péptido que tiene 6 o menos diferencias de sitios de aminoácido con SEQ ID Núm. 1; el enlazador es un péptido que tiene la secuencia mostrada por $(Gly)_mXaa-(Gly)_n$, en la que, m es un número entero comprendido entre 3 y 8, n es un número entero comprendido entre 3 y 8, Xaa es uno cualquiera seleccionado en el grupo consistente en Gly, Ser, Ala y Thr.
- 2.- La proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde la hormona peptídica es exendin-4 que tiene una secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 1.
- 3.- La proteína de fusión de la reivindicación 1 ó 2, en donde m es un número entero comprendido entre 4 y 6, y n es un número entero comprendido entre 4 y 6.
- 4.- La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el enlazador tiene la secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 3.
- 5.- La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el fragmento Fc de IgG2 es de origen humano.
- 6.- La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácido mostrada por SEQ ID Núm. 4.
- 7.- Secuencia de polinucleótido que codifica la proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 8.- Un vector que comprende la secuencia de polinucleótido según la reivindicación 7.
- 9.- Una célula anfitrión, en donde la célula anfitrión se genera por transfección de la célula receptora mediante el vector conforme a la reivindicación 8.
- 10.- La célula anfitrión según la reivindicación 9, en donde la célula receptora es la célula CHO o la célula NS0.
- 11.- Una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica comprende la proteína de fusión conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 12.- La composición farmacéutica conforme a la reivindicación 11, en donde la composición farmacéutica se administra como administración local, aerosol o inyección.
- 13.- La composición farmacéutica según la reivindicación 11 ó 12, **caracterizada porque** la inyección se administra mediante inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección intramuscular e inyección intravenosa.
- 14.- Uso de la proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la producción de medicamentos contra la diabetes y la obesidad.

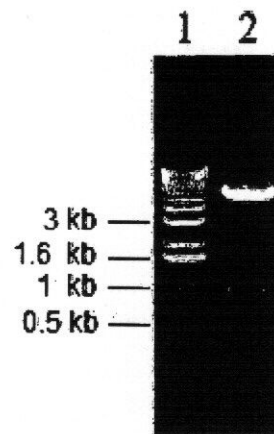


Fig. 1

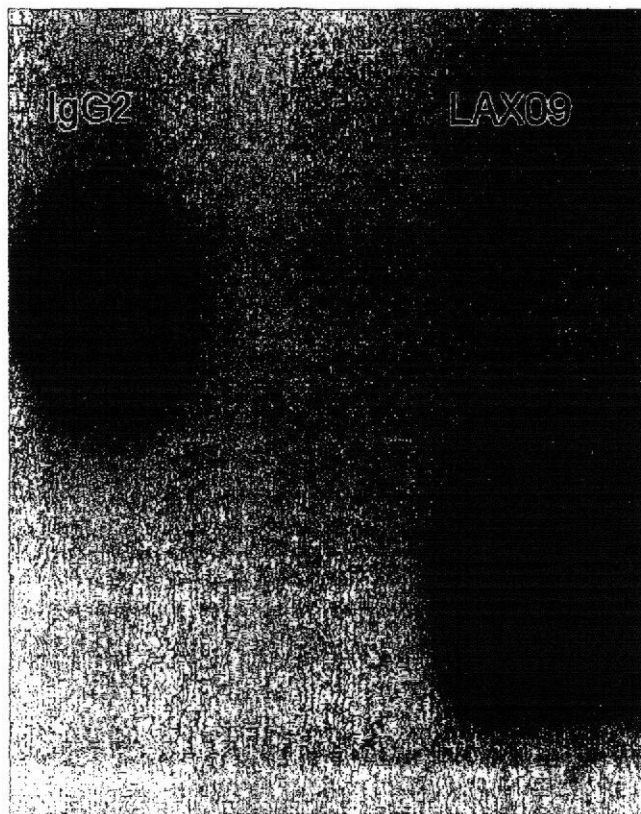


Fig. 2

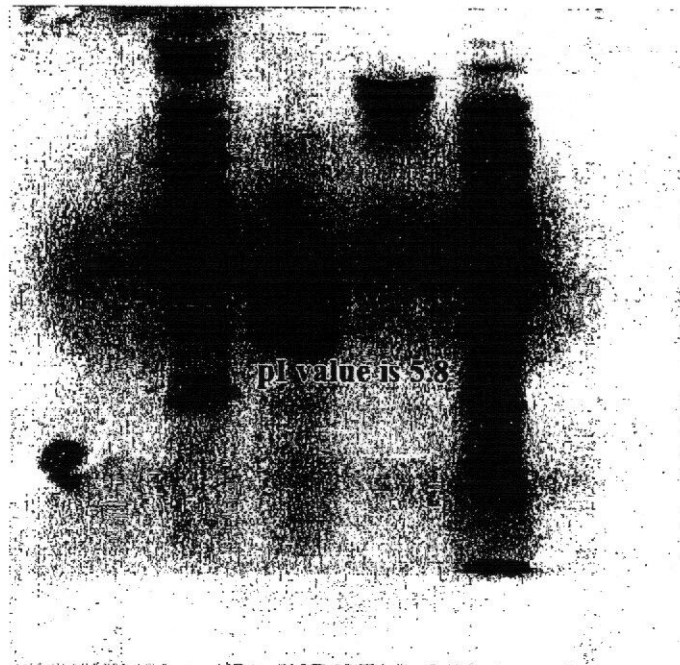


Fig. 3

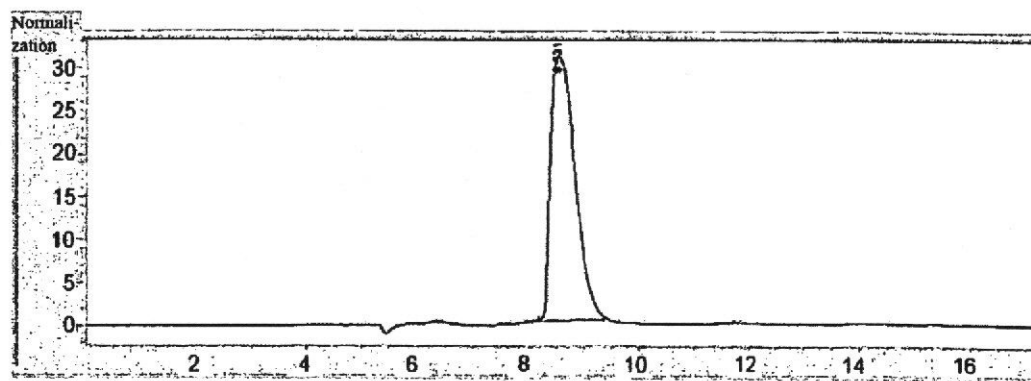
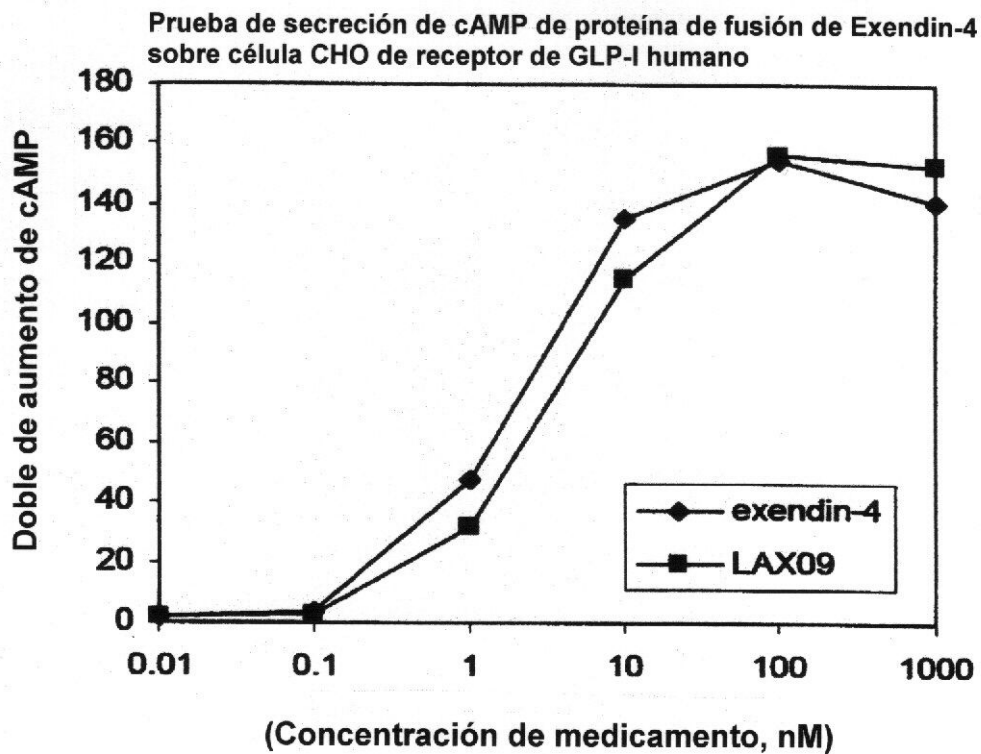
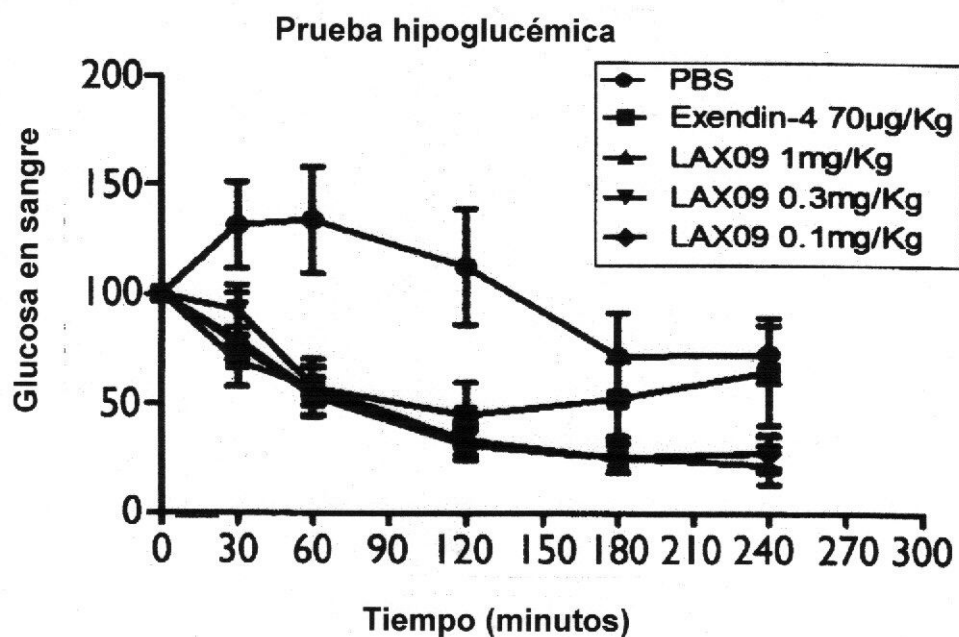


Fig. 4

Fig. 5**Fig. 6**

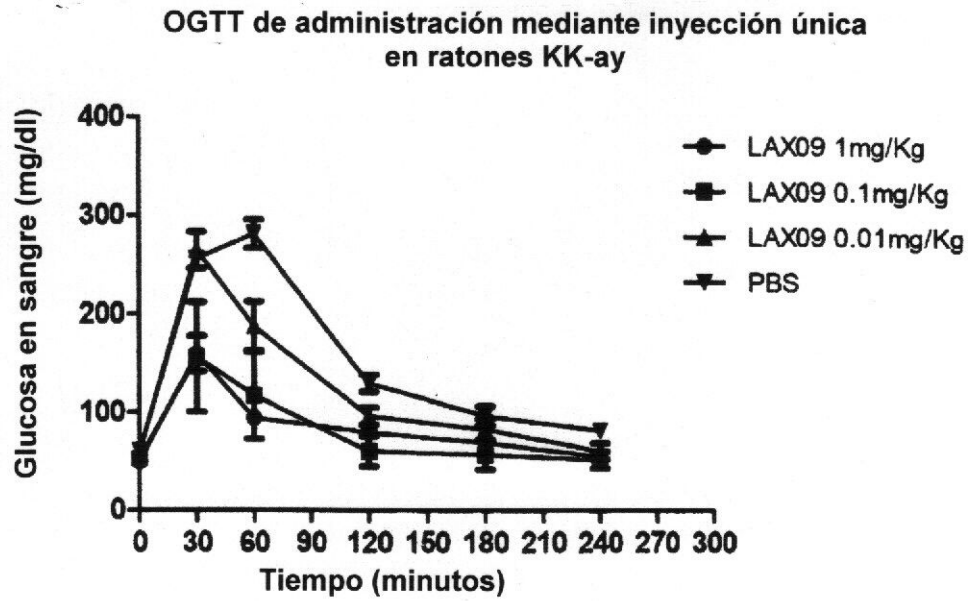


Fig. 7

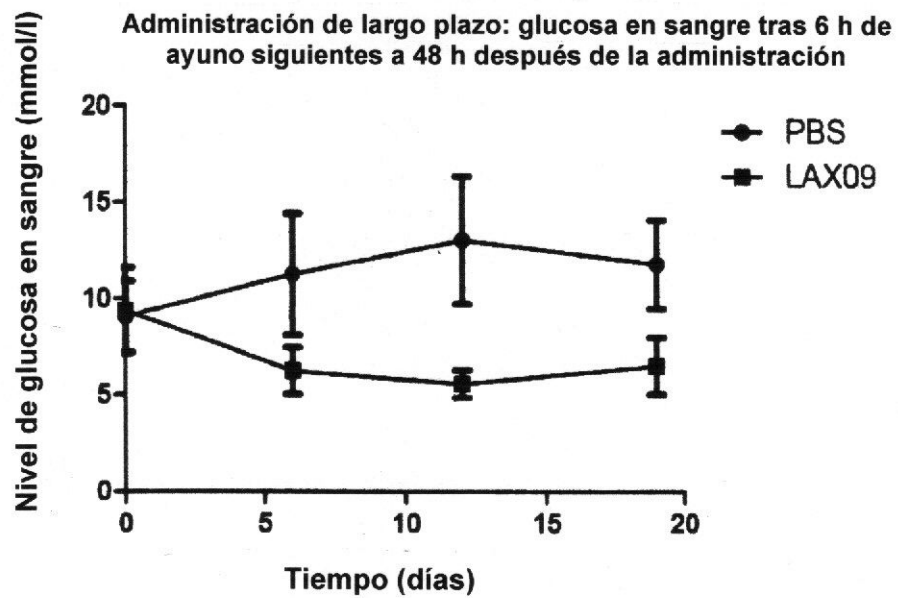


Fig. 8

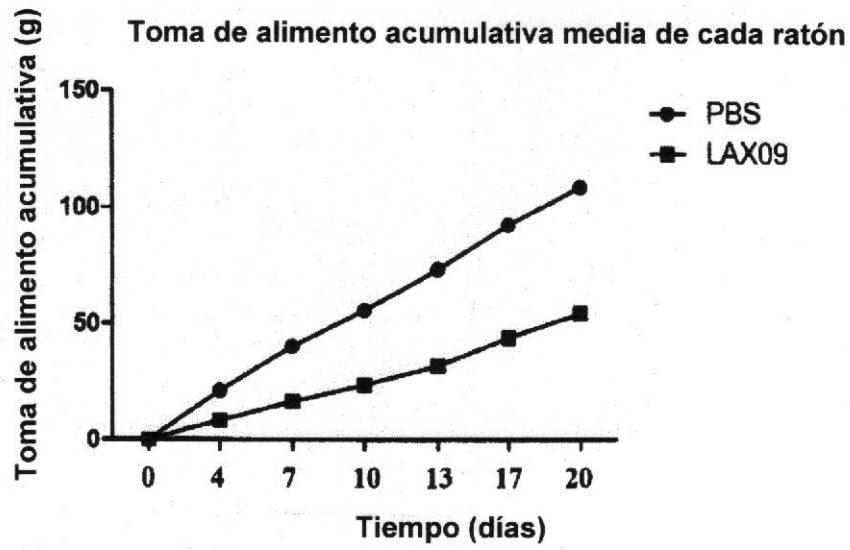


Fig. 9

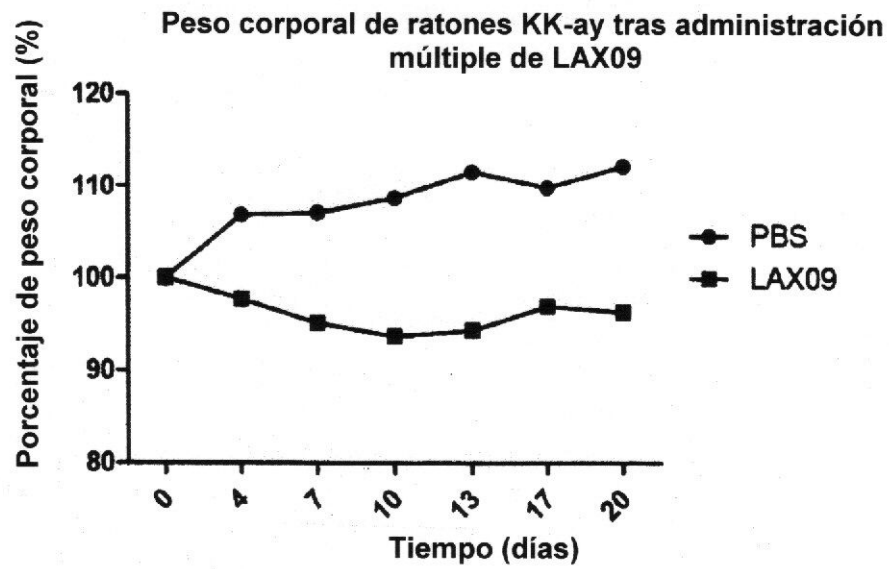


Fig. 10

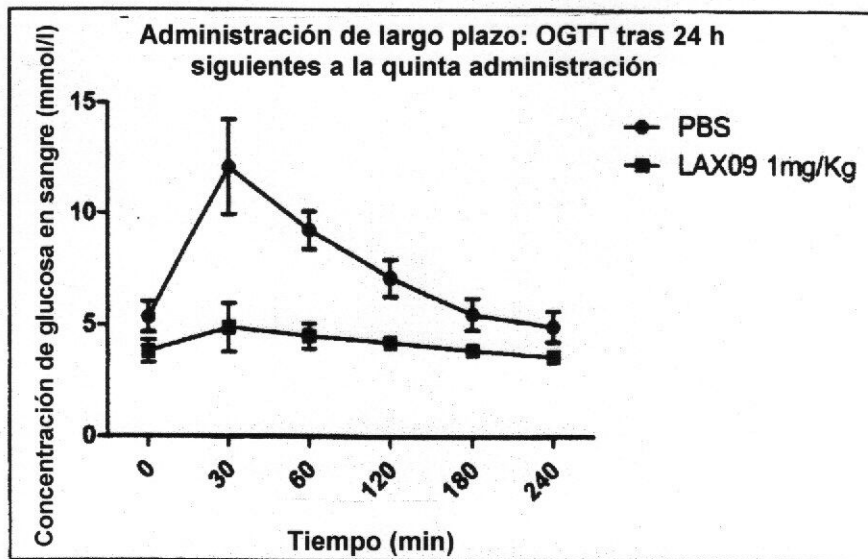


Fig. 11

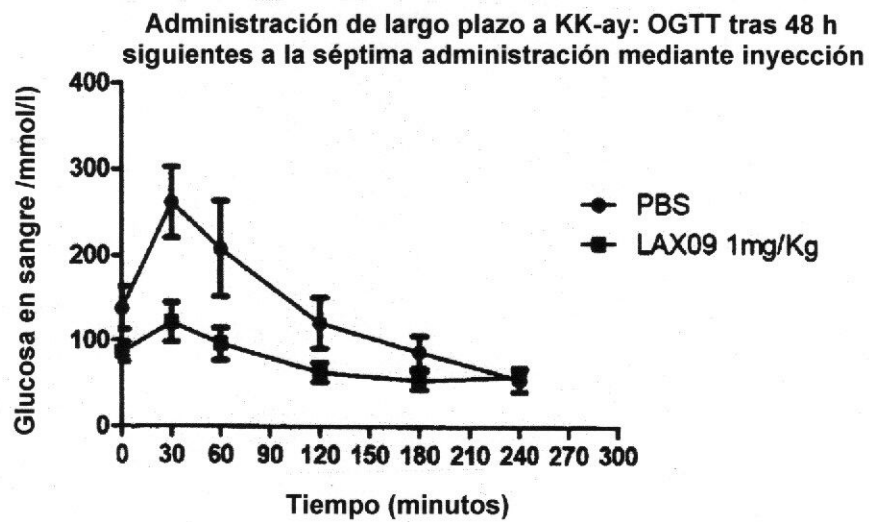


Fig. 12

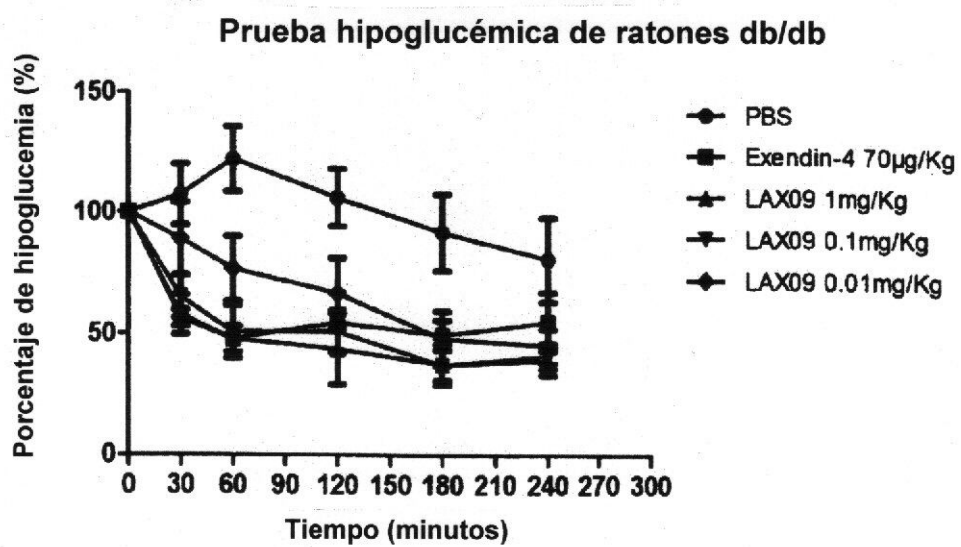


Fig. 13