

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 378**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2014 PCT/CN2014/082798**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15014228**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2014 E 14831257 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3029072**

54 Título: **Proteína de fusión de análogo de GLP-1 y método de preparación y uso de la misma**

30 Prioridad:

**01.08.2013 CN 201310331182**

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

**21.05.2019**

73 Titular/es:

**JIANGSU T-MAB BIOPHARMA CO., LTD. (100.0%)  
G03, No.1 Yaocheng Avenue China Medical City  
Taizhou, Jiangsu 225300, CN**

72 Inventor/es:

**HUANG, YANSHAN;  
YANG, ZHIYU;  
XU, ZHENGXUE y  
QIU, JIWAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 713 378 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 análogo de GLP-1 y método de preparación y uso de la misma

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína de fusión de análogo de GLP-1 novedosa y a un método para preparar la proteína de fusión. La proteína de fusión de análogo de GLP-1 se usa para tratar la diabetes y diversas enfermedades relacionadas o disfunciones.

10

## Antecedentes de la invención

El péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1) y análogos del mismo tales como exendina-4 se usan ampliamente por los investigadores en el tratamiento de diabetes de tipo -2. Como los polipéptidos de GLP-1 se inactivan rápidamente *in vivo* por la proteasa dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) y el periodo de semivida de los polipéptidos de GLP-1 en plasma es muy corta, es difícil la aplicación clínica extensiva de polipéptidos de GLP-1. Como la exendina-4 no es sensible a la degradación enzimática de DPP-IV, la estabilidad de la misma está aumentada, sin embargo, la masa molecular es inferior (4187,61 Da) y el periodo de semivida *in vivo* es corto, se necesitan dos inyecciones cada día de modo que se dificulta el uso clínico. Actualmente, se han hecho muchos esfuerzos por resolver el problema técnico mediante microesferas de liberación mantenida, modificación con PEG, modificación con cadena de ácido graso y fusión con albúmina, en la que la técnica de fusión con albúmina mantiene las funciones biológicas y curativas de las proteínas diana y mejora enormemente de forma simultánea el periodo de semivida *in vivo* de la misma mediante fusión con albúmina humana.

Aunque las preparaciones de GLP-1 y derivados de las mismas son realmente factibles para el tratamiento de la diabetes, se necesita administración continua a largo plazo una vez se han diagnosticado los pacientes diabéticos, los pacientes diabéticos tienen que aceptar el tratamiento durante toda la vida y, de este modo los requisitos sobre seguridad, economía y conveniencia de uso de las preparaciones son extremadamente elevados. Sin embargo, las preparaciones de fusión de GLP-1/HSA existentes tienen enormes defectos.

30

En primer lugar, en comparación con las moléculas de GLP-1, la masa molecular de la albúmina es grande. Por lo tanto, después de la fusión de las mismas, debido a la impedancia estérica, las proteínas de fusión de GLP-1/HSA no tienen actividad biológica sustancial. Albugon es una nueva proteína de fusión de GLP-1/HSA diseñada por Laurie L. Baggio, et al., que se caracteriza por que se inserta una molécula de GLP-1 adicional entremedias como un espaciador. Sin embargo, aproximadamente un 1 % únicamente de la actividad biológica de la misma se conserva. La disminución de la actividad biológica causa el gran aumento de la dosificación clínica (Laurie L. Baggio, Qingling Huang, Theodore J. Brown y Daniel J. Drucker, DIABETES Vol. 53: 2492-2500 (2004)). Por ejemplo, con respecto a un análogo de GLP-1 Byetta®, la dosificación de administración clínica es únicamente de 5-10 µg por vez y 1-2 veces por día. Sin embargo, la dosificación de administración eficaz clínica de Albugon alcanza 4 mg por día, cuyo número de moles está aumentado en aproximadamente 22 veces. El gran aumento de la dosificación clínica causa los dos siguientes problemas: 1) aumento de los riesgos de inmunogenicidad potencial; El aumento de la dosificación inevitablemente causa el aumento de la concentración de preparaciones de medicamentos debido a una limitación del volumen de administración, por ejemplo, la dosificación en una vez de la preparación de análogo de GLP-1 Byetta es únicamente de 5-10 µg (50 µ l), la concentración es únicamente de 0,25 mg/ml, sin embargo, la dosificación en una única vez clínica de Albugon alcanza 30 mg/persona y la concentración de la preparación alcanza hasta 30-50 mg/ml; durante el transporte y almacenamiento de preparaciones de proteína de alta concentración, el contenido de polímeros proteínicos se aumenta fácilmente; los investigadores han demostrado que el aumento de los polímeros proteínicos de tratamiento aumentará la inmunogenicidad (Anne S. De Groot y David W. Scott, Trends Immunol Vol. 28 N.º 11:482-490); los polímeros proteínicos recombinados activarán la hiperplasia de linfocitos B por entrecruzamiento de receptores de linfocitos B de modo que se posibilita la inmunidad de linfocitos B y linfocitos T (Rosenberg, A.S. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. AAPS J. 8: 501-507 (2006)); además, los polímeros proteínicos recombinados se fagocitan fácilmente por las células presentadoras de antígeno (APC), de modo que se acelera la madurez de las células dendríticas (DC) y, por lo tanto, se estimulan diversas respuestas inmunitarias (Anne S. De Groot y David W. Scott, Trends Immunol Vol. 28 N.º 11:482-490); y por lo tanto, el aumento notable de la dosificación de las preparaciones de proteína de fusión de GLP-1/HSA causará inevitablemente el aumento del riesgo de producción de anticuerpos; y 2) las preparaciones de proteína de fusión de GLP-1/HSA tienen que prepararse usando tecnologías de bioingeniería extremadamente complejas, el coste por cantidad unitaria de proteína es elevado y el gran aumento de la dosificación de administración causará que los pacientes diabéticos no puedan permitirse los medicamentos.

60

En segundo lugar, como la mayoría de las secuencias de GLP-1 son irregulares y están enroscadas y se degradan fácilmente debido al ataque por proteasa, un segundo GLP-1 añadido adicional causa que Albugon se vea atacado más fácilmente por proteasa y llegue a ser inestable. La inestabilidad muestra defectos en los dos siguientes aspectos: 1) cuando Albugon se recombina y expresa, independientemente de un sistema de expresión de levadura de bajo coste o un sistema de expresión de célula de mamífero de alto coste, la proteína de fusión de GLP-1/HSA secretada en el sobrenadante de cultivo se degrada fácilmente por proteasa, y la degradación no solamente da lugar a la

65

disminución del nivel de expresión, sino que también da lugar a la producción de muchos hidrolizados enzimáticos no uniformes, de modo que se provoca que los productos finales no sean uniformes; y 2) después de inyectar Albugon *in vivo*, Albugon se degrada fácilmente por proteasa y llega a ser ineficaz durante la circulación *in vivo*.

5 Además, debido a una limitación de la estabilidad del producto, actualmente todos estos productos tienen que almacenarse y transportarse a baja temperatura y, de ese modo, es muy inconveniente para los pacientes diabéticos llevar los productos cuando están fuera y viajando.

10 A partir del documento EP 1 724 284 A2 se conocen proteínas de fusión de GLP-1. Estas proteínas de fusión comprenden un primer polipéptido con un extremo N y un extremo C fusionado a un segundo polipéptido con un extremo N y un extremo C, en el que el primer polipéptido es un compuesto de GLP-1 y el segundo polipéptido se seleccionadas del grupo que consiste en albúmina humana, análogos de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana y en el que el extremo C del primer polipéptido se fusiona al extremo N del segundo polipéptido mediante un conector peptídico.

15 Sumario de la invención

20 El propósito de la presente invención es superar los defectos de la técnica anterior, diseñar y preparar una proteína de fusión de análogo de GLP-1 novedosa, que consiste en tres regiones de la siguiente manera: análogo de GLP-1-péptido conector-HSA (seroalbúmina humana). En comparación con los productos existentes, las notables ventajas de esta proteína de fusión son las siguientes:

25 1. La estabilidad térmica es mejor, la proteína de fusión puede almacenarse durante un largo plazo a temperatura ambiente sin causar que disminuya la actividad, y la proteína de fusión puede transportarse convenientemente con y usarse por los pacientes.

2. La estabilidad resistente a proteasa es mejor, la estabilidad en sobrenadante fermentado e *in vivo* es más de 3 veces la de la proteína de fusión existente y se facilita la preparación industrial.

30 3. La actividad biológica es mayor y la actividad biológica de la misma es más de 10 veces la de la proteína de fusión existente.

35 Los compuestos que contienen análogos de GLP-1 preparados adoptando la presente invención tienen las ventajas de coste de producción muy bajo, mayor actividad biológica y mejor estabilidad *in vivo* e *in vitro*, y de este modo se espera que los compuestos lleguen a ser un tipo mejor de medicamentos para el tratamiento de la diabetes.

En un primer aspecto, la presente invención divulga una proteínas de fusión de análogo de GLP-1 novedosa, cuya estructura es análogo de GLP-1-péptido conector-seroalbúmina humana (HSA).

40 En la proteína de fusión de análogo de GLP-1 divulgada por la presente invención, la primera región en la estructura de la misma es un análogo de GLP-1, en el que una secuencia del mismo es como se muestra por la SEQ ID NO. 1: HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLK; además, el análogo de GLP-1 también puede comprender 2 o 3 secuencias repetitivas de GLP-1 o análogos del mismo; y, además, la primera región también puede ser un homólogo exendina-4 con funciones similares a GLP-1.

45 Después de procesar GLP-1 natural *in vivo*, se cortan los 6 primeros aminoácidos de una molécula peptídica madura. Por lo tanto, de acuerdo con un hábito en la técnica, un primer aminoácido de GLP-1 se denomina como N.<sup>o</sup> 7. Como se muestra en la SEQ ID NO. 1, todos los aminoácidos del polipéptido se enumeran de forma continua. Por ejemplo, el 7.<sup>o</sup> sitio es una histidina y el 8.<sup>o</sup> es una glicina. Pueden remplazarse posiciones no conservativas en la secuencia de GLP-1 por otros aminoácidos sin cambiar la actividad de la misma. Por ejemplo, Gly8→Ala, Ser o Cys, Glu9→Asp, Gli, Ser, Cys, Thr, Asp, Gln, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met o Phe; Gly10→Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met o Phe, Asp1S→Glu, Va116→Leu o Tyr; Ser18→Lys, Glu21→Asp, Ala24→Arg; Lys26→Gly, Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Arg; Lys34→Gly, Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Arg. El extremo C de GLP-1 puede tener una deficiencia de 1,2 o 3 aminoácidos (Wolfgang Glaesner et al., patente de Estados Unidos US7452966).

50 En la proteína de fusión de análogo de GLP-1, la segunda región en la estructura de la misma es un péptido de conexión. Un extremo N del péptido conector se conecta con un extremo C de la primera región mediante un enlace peptídico, y un extremo C del péptido conector se conecta con el extremo N de la HSA mediante un enlace peptídico.

60 Además, la secuencia del péptido conector se selecciona de:

a) GGGSSPPPGGGGSS (SEQ ID NO. 11)

65 b) GGGSSGGGSSPPPAGGGSSGGGSS (SEQ ID NO. 12)

- c) GGGAPPPPPPPSSGGG (SEQ ID NO. 13)
- d) AGGGAAGGGSSGGPPPPGGGGS (SEQ ID NO. 14)

- 5 e) GGSSGAPPPGGGGS (SEQ ID NO. 15)
- f) GGGSSGAPPSGGGSSGGGSSGGGGS (SEQ ID NO. 16)

10 En la proteína de fusión de análogo de GLP-1, una tercera región en la estructura de la misma es seroalbúmina humana (HSA). Una secuencia de la misma es como se muestra por la SEQ ID NO. 2. Pueden remplazarse posiciones no conservativas en la secuencia de HSA por otros aminoácidos sin cambiar la actividad de la misma, tales como Cys34→Ser, Leu407→Ala, Leu408→Val, Val409→Ala, Arg410→Ala, Lys413→Gln (Plumridge et al., patente internacional WO2011051489). SEQ ID NO. 2:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE  
 NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQKQEPERNECFLQHKDDNPPLRVRPE  
 VDMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACL  
 PKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT  
 KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP  
 ADLPSLAADFVESKDVCCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTL  
 KCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV  
 STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC  
 TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKA  
 15 TKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1 puede seleccionarse de las SEQ ID NO. 3-5.

- 20 a) SEQ ID NO. 3:

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGSSPPPGGGSSDAHKSEVAHRFKDLGEEN  
 FKALVLIAFAQYLQQCFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVAT  
 LRETYGEMADCCAQKQEPERNECFLQHKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLY  
 LYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACL  
 PKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDR  
 ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCCKNY  
 AEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFK  
 PLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCC  
 KHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC  
 TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC  
 KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

- 25 b) SEQ ID NO. 4:

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAPPPPPPPSSGGGDAHKSEVAHRFKDL  
GEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKL  
CTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEET  
FLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASS  
AKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEC  
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD  
VCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV  
FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG  
SKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD

ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV  
EKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

c) SEQ ID NO. 5:

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGSSGAPPPSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSE  
VAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSL  
HTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCT  
AFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL  
RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTEC  
CHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLA  
ADFVESKD VCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAAD  
PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV  
SRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRR  
PCFSALEVD  
5 ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFV  
EKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

En un segundo aspecto, la presente invención divulga un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de análogo de GLP-1.

10 En realizaciones preferidas de la presente invención, una secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1 es la SEQ ID NO. 10 y una secuencia proteínica correspondiente de la misma es la SEQ ID NO. 5. La secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1 divulgada por la presente invención también puede ser la SEQ ID NO. 8 y la secuencia proteínica correspondiente de la misma es la SEQ ID NO. 3; o la secuencia codificante de nucleótidos es la SEQ ID NO. 9 y la secuencia proteínica correspondiente de la  
15 misma es la SEQ ID NO. 4.

SEQ ID NO. 8: secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

ES 2 713 378 T3

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTCAAAGGTGGTGGATCTTCTCCACCACCAGGTGGTGG  
AGGCTCTTCAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAA  
GAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATT  
TGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTG  
ATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGC  
ACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTCAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAAACAAG  
AACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCCG  
ATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACA  
TTTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAA  
CTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGAT  
AAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGT  
CTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCA  
AAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGT  
TTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTG  
CTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTC  
GATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGC  
ATTGCCGAAGTGGAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTT  
TGTTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAACCTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGC  
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCTGCTGAGA  
CTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATG  
AATGCTATGCCAAAGTGTTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTA  
ATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATCCAGAATGCGC  
TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTCTGTAGAGGTC  
TCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGA  
ATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGA  
GAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAAAAATGCTGCACAGAGTCCTTGGTGAACAG  
GCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATG  
CTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATC  
AAGAAACAAACTGCACTTGTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGA  
GCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTTCGACAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCT  
GACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTGCTGCAAGTCAA  
GCTGCCTTAGGCTTATAA

SEQ ID NO. 9: secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

ES 2 713 378 T3

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAGGCGGGGGTGCTCCACCACCACCACCACCACC  
ACCACCACCATCTTCCGGAGGCGGTGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTT  
AAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCT  
TCAGCAGTGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAA  
AAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTT  
GGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACT  
GCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACA  
ACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT  
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTA  
CTTTTATGCCCGGAACCTTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATG  
TTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAGCTCGATGAACTTCGGGAT  
GAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAATTT  
GGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAA  
GCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAAT  
GCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATC  
TGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGT  
TGAAAAATCCCCTGCATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCC  
TTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACCTATGCTGAGGCAA  
AGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTG  
TCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGC  
CGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGG  
AAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTA  
CAAATTCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTC  
CAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACA  
TCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAG  
TTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACAAAATGCTGCACAG  
  
AGTCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGT  
TCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCATGCAGATATATGCACACTTCTG  
AGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTGAGCTTGTGAAACACAAGC  
CCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTGCGAGCTTTTGTAGA  
GAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACT  
TGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAA

SEQ ID NO. 10: secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
 AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAGGCGGTGGATCTTCTGGTGCTCCACCACCATCT  
 GGTGGTGGAGGCTCTGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGCGGGGTTTCCAGATGCACACAAG  
 AGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGT  
 TGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGA  
 ATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGA  
 CAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAA  
 CCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCCTGAGAGAAATGAATGCTT  
 CTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGAT  
 GTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGA  
 AATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTA  
 TAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAA  
 AGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGT  
 GTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCT  
 GAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCAAAGTTAGTGACAGATCTT  
 ACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGG  
 CGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTTCGATCTCCAGTAAACTGAAGGAA  
 TGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAATGATG  
 AGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGC  
 AAAAATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG  
 AAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCA  
 CTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTTCGAT  
 GAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTT  
 TGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCAGAATGCGCTATTAGTTTCGTTACACCAAGAAA  
 GTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGG  
 GCAGCAAATGTTGTAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCT  
 ATCCGTGGTCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGA  
 GTCACAAAATGCTGCACAGAGTTCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTTCAGCTCTGG  
 AAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCA  
 GATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTG  
 AGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATG  
 ATTTTCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGC  
 CGAGGAGGGTAAAAAACTTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAA

- 5 La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de análogo de GLP-1 puede prepararse mediante cualquier técnica apropiada bien conocida por los expertos en la materia incluyendo, aunque sin limitación, técnica de ADN recombinante, síntesis química y similares; y también, en primer lugar puede sintetizarse una secuencia de nucleótidos que tiene una secuencia de aminoácidos de GLP-1 y después las secuencias se interponen, remplazan o eliminan mediante mutación dirigida al sitio, mutagénesis dirigida u otras técnicas bien conocidas en la técnica para obtener la secuencia de nucleótidos necesaria.
- 10 La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína transportadora puede prepararse mediante cualquier técnica apropiada bien conocida para los expertos en la materia. En una realización específica de la presente invención, la secuencia de nucleótidos de la proteína transportadora es una secuencia de nucleótidos que codifica HSA o al menos mantiene un 95 % de consistencia con la secuencia de nucleótidos que codifica HSA.
- 15 Para una técnica de fusión entre la secuencia de nucleótidos que codifica el análogo de GLP-1 y la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína transportadora, véase la descripción general en la técnica, tal como Molecular Cloning (J. Sambrook et al., Science Press, 1995).

En un tercer aspecto, la presente invención divulga un método para preparar la proteína de fusión mencionada anteriormente. El método comprende las siguientes etapas: construir un vector de expresión que contiene una secuencia génica de la proteína de fusión, después transformar el vector de expresión que contiene la secuencia génica de la proteína de fusión en una célula hospedadora para la expresión inducida y separar y obtener la proteína de fusión de los productos de expresión.

El vector de expresión para construir la secuencia génica que contiene la proteína de fusión puede obtenerse sintetizando en primer lugar la secuencia de nucleótidos que codifica el análogo de GLP-1, después fusionando la secuencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos que codifica HSA y finalmente construyendo un vector de expresión apropiado.

La secuencia génica que expresa la proteína de fusión de análogo de GLP-1 puede expresarse mediante sistemas de expresión bien conocidos para los expertos en la materia incluyendo, aunque sin limitación, bacterias transformadas usando vectores tales como fagos recombinantes y plásmidos, levadura transformada usando vectores de expresión de levadura, hongos filamentosos transformados usando vectores de hongos, células de insecto y células animales infectadas usando vectores víricos y similares. En una realización específica de la presente invención, la sistema de expresión selecciona y uso expresión de secreción de *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* tiene un alto nivel de expresión y es de bajo coste y tiene las ventajas de procesamiento, plegamiento y modificación postraduccional de proteínas de un sistema de expresión eucariota. Durante la producción real, las células pueden cultivarse mediante un matraz de agitación en un laboratorio o pueden cultivarse mediante fermentación en un tanque de fermentación (incluyendo fermentación continua, discontinua, semicontinua y en estado sólido).

La proteína de fusión que se secreta al medio de cultivo puede purificarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia incluyendo, aunque sin limitación, ultrafiltración, precipitación en sulfato de amonio, precipitación con acetona, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase inversa, cromatografía en tamiz molecular y similares. En una realización específica de la presente invención, el autor de la invención adopta un medio cromatográfico de tres etapas que une cromatografía de afinidad, cromatografía hidrófoba y cromatografía de intercambio iónico para posibilitar que la proteína de fusión se purifique uniformemente.

En un cuarto aspecto, la presente invención divulga la proteína de fusión de análogo de GLP-1 para su uso como medicamento.

En un quinto aspecto, la presente invención divulga una composición farmacéutica que contiene la proteína de fusión de análogo de GLP-1 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica se usa principalmente para tratar la diabetes y enfermedades relacionadas.

En un sexto aspecto, la presente invención divulga una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes y enfermedades relacionadas con diabetes, que contiene la proteína de fusión de análogo de GLP-1 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las enfermedades relacionadas incluyen diabetes de tipo-2, diabetes de tipo-1, obesidad, eventos cardiovasculares graves de pacientes que padecen diabetes de tipo-2 y otras complicaciones graves (Madsbad S, Kielgast U, Asmar M, et al. Diabetes Obes Metab. mayo de 2011;13(5):394-407;Issa CM, Azar ST.Curr Diab Rep, octubre de 2012;12(5):560-567; Neff LM, Kushner RF. Diabetes Metab Syndr Obes, 20 de julio de 2010;3:263-273;Sivertsen J, Rosenmeier J, Holst JJ, et al. Nat Rev Cardiol, 31 de enero de 2012;9(4):209-222).

Los vehículos inorgánicos u orgánicos inactivos bien conocidos para los expertos en la materia incluyen (aunque sin limitación) sacáridos y derivados de los mismos, aminoácidos o derivados de los mismos, tensioactivos, aceite vegetal, cera, grasa y compuestos polihidroxi tales como polietilenglicol, alcoholes, glicerol, diversos conservantes, antioxidantes, estabilizantes, sales, solución tamponante, agua y similares que pueden añadirse a los mismos, y estas sustancias se usan para mejorar la estabilidad de la composición o mejorar la actividad o eficacia biológica de la misma de acuerdo con las necesidades.

La composición farmacéutica divulgada por la presente invención puede prepararse adoptando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia, incluyendo formas líquidas o en gel, liofilizadas u otras formas, para producir medicamentos que sean estables durante el almacenamiento y sean adecuadas para su administración a seres humanos o animales.

En un séptimo aspecto, la presente invención divulga la proteína de fusión de análogo de GLP-1 para su uso en el tratamiento de la diabetes y enfermedades relacionadas con diabetes.

Para la proteína de fusión mencionada anteriormente para su uso en el tratamiento de pacientes que padecen diabetes no insulino dependiente o insulino dependiente, obesidad y otras diversas enfermedades, puede hacerse una referencia a las preparaciones medicinales de GLP-1 existentes tales como Byetta® (péptido análogo de GLP-1), Albugon®

(proteína de fusión de GLP-1/HSA) y Dulaglutide® (proteína de fusión de GLP-1/Fc, y el intervalo de dosificación de las mismas es de 0,05-1 mg/kg.

5 La proteína divulgada por la presente invención puede administrarse en solitario, administrarse mediante diversas combinaciones o administrarse junto con otras preparaciones de tratamiento.

En la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas:  
GLP-1 (proteína-1 de tipo glucagón); HSA (seroalbúmina humana)

10 Descripción de los dibujos

La fig. 1 ilustra un SDS-PAGE de la expresión de proteínas de fusión de análogo de GLP-1 con diferentes estructuras, en la que los carriles 1-9 son respectivamente los resultados de expresión de proteínas de fusión con las secuencias n.º 1-9.

15 Las fig. 2A-D ilustran los resultados de un ensayo farmacodinámico de una proteína de fusión de análogo de GLP-1 después de inyección subcutánea de una única dosis en un macaco de la India normal, en la que

20 La fig. 2A ilustra los niveles de glucosa en sangre de un macaco de la India durante la infusión gradual de glucosa después de 1 día tras inyección subcutánea de GLP-1-E3-HSA.

La fig. 2B ilustra los niveles de glucosa en sangre de un macaco de la India durante la infusión gradual de glucosa después de 4 días tras inyección subcutánea de GLP-1-E3-HSA.

25 La fig. 2C ilustra los niveles de insulina de un macaco de la India durante la infusión gradual de glucosa después de 1 día tras inyección subcutánea de GLP-1-E3-HSA.

La fig. 2D ilustra los niveles de insulina de un macaco de la India durante la infusión gradual de glucosa después de 4 días tras inyección subcutánea de GLP-1-E3-HSA.

30 La fig. 3 ilustra un gráfico de la curva de concentración-tiempo después de administración de una única dosis a un macaco de la India.

DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS:

35 SEQ ID NO. 1: secuencia de aminoácidos de análogo de GLP-1

SEQ ID NO. 2: Secuencia de aminoácidos de HSA

40 SEQ ID NO. 3: Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión de análogo de GLP-1

SEQ ID NO. 4: Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión de análogo de GLP-1

45 SEQ ID NO. 5: Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión de análogo de GLP-1

SEQ ID NO. 6: Secuencia codificante de nucleótidos de análogo de GLP-1

SEQ ID NO. 7: Secuencia codificante de nucleótidos de HSA

50 SEQ ID NO. 8: secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

SEQ ID NO. 9: secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

55 SEQ ID NO. 10: secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

La presente invención se describirá a continuación mediante realizaciones específicas. Un experto en la materia puede entender fácilmente otras ventajas y eficacias de la presente invención de acuerdo con los contenidos divulgados por la descripción. La presente invención también puede implementarse o aplicarse mediante otras realizaciones específicas diferentes. Pueden hacerse diversas modificaciones o cambios a todos los detalles en la descripción basándose en diferentes puntos de vista y aplicaciones sin alejarse del espíritu de la presente invención.

65 Salvo que se indique de otro modo, los métodos experimentales, métodos de detección, métodos de preparación divulgados por la presente invención adoptan las técnicas convencionales de biología molecular, bioquímica,

estructura de cromatina y análisis, química analítica, cultivo celular, ADN recombinante en la técnica y técnicas convencionales en técnicas relacionadas.

Realización 1: construcción de plásmido de expresión de proteína de fusión recombinante

5

Secuencia codificante de nucleótidos de análogo de GLP-1 (SEQ ID NO. 6):

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAA

10

1.1 Segmento génico de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub> con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3':

Se sintetizó de forma artificial una secuencia oligonucleotídica (SEQ ID NO. 17) de la siguiente manera:

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAACACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAG  
TTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGATGCA  
CACAAGAGTGAGG

15

en la que la parte marcada con una línea es una secuencia génica de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub> y la otra parte es una secuencia codificante del extremo N de HSA.

20

1.2 Segmento génico de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3':

Se sintetizó de forma artificial una secuencia oligonucleotídica (SEQ ID NO. 18) de la siguiente manera:

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGTGGTGGAGGCTCTGGAGGTGGAGGTTCCG  
GAGGCGGGGGTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

25

en la que la parte marcada con una línea es una secuencia génica de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> y la otra parte es una secuencia codificante del extremo N de HSA.

30

1.3 Segmento génico de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3':

Se sintetizó de forma artificial una secuencia oligonucleotídica (SEQ ID NO. 19) de la siguiente manera:

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGTGGAGGCTCTGG  
AGGTGGAGGTTCCGGAGGCGGGGGTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

35

en la que la parte marcada con una línea es una secuencia génica de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> y la otra parte es una secuencia codificante del extremo N de HSA.

40

1.4 Segmento génico de análogo de GLP-1-EI con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3':

Se sintetizó de forma artificial una secuencia oligonucleotídica (SEQ ID NO. 20) de la siguiente manera:

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGTGGTGGATCTTCTCCACCACAGGTGGTGG  
AGGCTCTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

45

en la que la parte marcada con una línea es una secuencia génica de análogo de GLP-1-EI y la otra parte es una secuencia codificante del extremo N de HSA.

1.5 Segmento génico de análogo de GLP-1-E2 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3':

Se sintetizó de forma artificial una secuencia oligonucleotídica (SEQ ID NO. 21) de la siguiente manera:

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTCAAAGGTGGAGGCTCTTCAGGTGGAGGCTCTTCACC  
ACCACCAGCTGGTGGAGGCTCTTCAGGTGGAGGCTCTTCAGATGCACACAAGAGTGA  
 GG

en la que la parte marcada con una línea es una secuencia génica de análogo de GLP-1-E2 y la otra parte es una secuencia codificante del extremo N de HSA.

5

1.6 Segmento génico de análogo de GLP-1-E3 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3':

Se sintetizó de forma artificial una secuencia oligonucleotídica (SEQ ID NO. 22) de la siguiente manera:

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTCAAAGGCGGGGGTCTCCACCACCACCACCACC  
ACCACCACCATCTTCCGGAGGCGGTGATGCACACAAGAGTGAGG

10

en la que la parte marcada con una línea es una secuencia génica de análogo de GLP-1-E3 y la otra parte es una secuencia codificante del extremo N de HSA.

15

1.7 Segmento génico de análogo de GLP-1-E4 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3':

Se sintetizó de forma artificial una secuencia oligonucleotídica (SEQ ID NO. 23) de la siguiente manera:

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTCAAAGCTGGCGGGGGTCTGCTGGAGGCGGGTCTTC  
TGGCGGGGGTCCACCACCACCACCAGGAGGCGGGGGTTCAGATGCACACAAGAGTGA  
 GG

20

en la que la parte marcada con una línea es una secuencia génica de análogo de GLP-1-E4 y la otra parte es una secuencia codificante del extremo N de HSA.

25

1.8 Segmento génico de análogo de GLP-1-E5 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3':

Se sintetizó de forma artificial una secuencia oligonucleotídica (SEQ ID NO. 24) de la siguiente manera:

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTCAAAGGTGGATCTTCTGGTGGTCCACCACCACCAGG  
AGGCGGGGGTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

30

en la que la parte marcada con una línea es una secuencia génica de análogo de GLP-1-E5 y la otra parte es una secuencia codificante del extremo N de HSA.

1.9 Segmento génico de análogo de GLP-1-E6 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3':

35

Se sintetizó de forma artificial una secuencia oligonucleotídica (SEQ ID NO. 25) de la siguiente manera:

CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCA  
AGGAATTCATTGCTTGGCTGGTCAAAGGCGGTGGATCTTCTGGTGGTCCACCACCATCT  
GGTGGTGGAGGCTCTGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGCGGGGGTTCAGATGCACACAAG  
 AGTGAGG

40

en la que la parte marcada con una línea es una secuencia génica de análogo de GLP-1-E6 y la otra parte es una secuencia codificante del extremo N de HSA.

E1: GGGSSPPPGGGGSS (SEQ ID NO. 11)

E2: GGGSSGGSSPPPAGGGSSGGSS (SEQ ID NO. 12)

# ES 2 713 378 T3

E3: GGGAPPPPPPPSSGGG (SEQ ID NO. 13)

E4: AGGGAAGGGSSGGPPPPGGGG (SEQ ID NO. 14)

5 E5: GGSSGAPPPGGGG (SEQ ID NO. 15)

E6: GGGSSGAPPSGGGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO. 16)

10 Notas:  $(Xaa)_x-(Pro)_y-(Xaa)_z$ , en la que Xaa es uno o cualquier combinación de una pluralidad de G, A y S,  $x, z \geq 3$ ,  $26 \geq x+y+z \geq 14$ ,  $10 \geq y \geq 3$  y  $1 \geq y/(x+z) \geq 0,13$ . Un extremo N del péptido de conexión se conecta con un extremo C de la primera región mediante un enlace peptídico, y un extremo C del péptido de conexión se conecta con un extremo N de la HSA mediante un enlace peptídico.

Zona de potenciación	X	Y	Z	X+Y+Z	Y/(X+Z)
E1	5	3	6	14	0,272727
E2	10	3	11	24	0,142857
E3	4	10	7	21	0,909091
E4	14	5	5	24	0,263158
E5	6	4	5	15	0,363636
E6	7	3	16	26	0,130435

15 2. Amplificación del gen de HSA

Secuencia codificante de nucleótidos de HSA (SEQ ID NO. 7):

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCA  
AAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGAAGATCAT  
GTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAG  
CTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATAACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCA  
ACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAAACAAGAACCTGAGA  
GAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAG  
ACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAA  
AAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGAACTCCTTTTC  
TTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGC  
CTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAA  
CAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGG  
GCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGT  
TAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGT  
GCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAG  
TAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAA  
GTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAG  
TAAGGATGTTTGCAAAAACCTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGT

20

ATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAG  
 ACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGC  
 CAAAGTGTTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAA  
 AATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATCCAGAATGCGCTATTAGTTTCG  
 TTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAAC  
 CTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGT  
 GCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCC  
 AGTAAAGTGACAGAGTCACAAAATGCTGCACAGAGTCCTTGGTGAACAGGCCGACCATG  
 CTTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACAT  
 TCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACA  
 AACTGCACTTGTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAA  
 AGCTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAG  
 GAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAG  
 GCTTATAA

Diseño de cebador:

- 5 GLP-1/P1 (SEQ ID NO. 26): 5' -TCTCTCGAGAAAAGACACGGCGAAGGGACCTTTACCA GTG-3' (sitio de restricción para la enzima XhoI)  
 HSA/P1 (SEQ ID NO. 27): 5' -GAT G CACACAAGAGTGAGG-3'  
 HSA/P2 (SEQ ID NO. 28): 5' -TTAGCGGCCGCTTATAAGCCTAAGGCAGCTTG-3' -(sitio de restricción para la enzima NotI)

10 Se usó clon de ADNc del gen de seroalbúmina humana/HSA/ALB/gen del clon de ORF (Sino Biological Inc.) como molde, se usaron HSA/P1 y HSA/P2 como cebadores, se amplificó un segmento de HSA y un sistema de PCR que incluía 0,5 µl de molde, 1 µl de 25 µmol/l HSA/P1 y HSA/P2, respectivamente, 4 µl de 2 mmol/l de dNTP, 10 µl de solución de tampón de reacción PS 5x, 2,5 U de ADN polimerasa PrimerStar y se añadió ddH<sub>2</sub>O hasta 50 µl.

15 Las condiciones de PCR incluían desnaturalización durante 10 min a 98 °C y 1 min y 48 s a 68 °C, 25 ciclos y después conservación con calor a 4 °C. Para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1750 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

### 20 3. Amplificación del gen de fusión

#### 3.1 Amplificación del gen de fusión de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA

25 Se usó mezcla de segmentos génicos de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub> y productos de PCR de HSA mezclados en igualdad de moles como molde, se usaron GLP-1/P1 y HSA/P2 como cebadores, se amplificó (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA y un sistema de PCR que incluía 0,5 µl de molde, 1 µl de 25 µmol/l de GLP-1/P1 y HSA/P2 respectivamente, 4 µl de 2 mmol/l de dNTP, 10 µl de solución de tampón de reacción PS 5x, 2,5 U de ADN polimerasa PrimerStar y se añadió ddH<sub>2</sub>O hasta 50 µl. Las condiciones de PCR incluían 10 s a 98 °C y 2 min y 30 s a 68 °C, 25 ciclos y después conservación con calor a 4 °C. Para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1950 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

#### 3.2 Amplificación del gen de fusión de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-HSA

35 Se usó mezcla de segmentos génicos de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> y productos de PCR de HSA mezclados en igualdad de moles como molde, un sistema de PCR y las condiciones de PCR fueron las mismas que las de 3.1, y para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1930 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

#### 3.3 Amplificación del gen de fusión de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-HSA

40 Se usó mezcla de segmentos génicos de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> y productos de PCR de HSA mezclados en igualdad de moles como molde, un sistema de PCR y las condiciones de PCR fueron las mismas que las de 3.1, y para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1950 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

#### 45 3.4 Amplificación del gen de fusión de análogo de GLP-1-EI-HSA

Se usó mezcla de segmentos génicos de análogo de GLP-1-E1 y productos de PCR de HSA mezclados en igualdad de moles como molde, un sistema de PCR y las condiciones de PCR fueron las mismas que las de 3.1, y para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1930 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

5

### 3.5 Amplificación del gen de fusión de análogo de GLP-1-E2-HSA

Se usó mezcla de segmentos génicos de análogo de GLP-1-E2 y productos de PCR de HSA mezclados en igualdad de moles como molde, un sistema de PCR y las condiciones de PCR fueron las mismas que las de 3.1, y para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1960 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

10

### 3.6 Amplificación del gen de fusión de análogo de GLP-1-E3-HSA

Se usó mezcla de segmentos génicos de análogo de GLP-1-E3 y productos de PCR de HSA mezclados en igualdad de moles como molde, un sistema de PCR y las condiciones de PCR fueron las mismas que las de 3.1, y para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1940 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

15

### 3.7 Amplificación del gen de fusión de análogo de GLP-1-E4-HSA

Se usó mezcla de segmentos génicos de análogo de GLP-1-E4 y productos de PCR de HSA mezclados en igualdad de moles como molde, un sistema de PCR y las condiciones de PCR fueron las mismas que las de 3.1, y para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1960 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

20

### 3.8 Amplificación del gen de fusión de análogo de GLP-1-E5-HSA

Se usó mezcla de segmentos génicos de análogo de GLP-1-E5 y productos de PCR de HSA mezclados en igualdad de moles como molde, un sistema de PCR y las condiciones de PCR fueron las mismas que las de 3.1, y para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1930 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

30

### 3.9 Amplificación del gen de fusión de análogo de GLP-1-E6-HSA

Se usó mezcla de segmentos génicos de análogo de GLP-1-E6 y productos de PCR de HSA mezclados en igualdad de moles como molde, un sistema de PCR y las condiciones de PCR fueron las mismas que las de 3.1, y para los productos de PCR, se recuperaron bandas con masa molecular de aproximadamente 1970 pb mediante extracción de gel usando electroforesis en gel de agarosa.

35

40

## 4. Construcción de plásmido de expresión de proteína de fusión

### 4.1 Construcción de plásmido de expresión de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA

En primer lugar, se realizó restricción con dos enzimas XhoI y NotI en un plásmido de vector de expresión pPIC9. Las condiciones específicas fueron las siguientes: 10 µl del plásmido de vector de expresión pPIC9; 1 µl de XhoI, 1 µl de NotI y 4 µl de solución de tampón de restricción enzimática 10x (H) (adquirido de Takara); t 24 µl de ddH<sub>2</sub>O y un volumen total de 40 µl. Se realizó restricción similar con dos enzimas en un segmento de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA. Se realizó reacción durante 2 h en un baño de agua de temperatura constante a 37 °C, y se recuperó el ADN plasmídico linealizado y el segmento génico de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA mediante electroforesis en gel de agarosa. El vector y el segmento génico recuperados se ligaron para construir un plásmido de expresión de proteína de fusión (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA/pPIC9. Un sistema de ligamiento en general era de 10 µl de volumen, siendo la relación molar del vector a los segmentos génicos de 1: (2-10), incluyendo 1 µl de solución de tampón de ADN ligasa T4 10x, 1 µl de ADN ligasa T4 y agua estéril añadida hasta 10 µl. Se realizó reacción de ligamiento durante 1 h en un baño de agua de temperatura constante a 16 °C. Los productos de ligamiento se transformaron en células competentes de *E. coli Top10*, las placas de clones transformados se sometieron a identificación por PCR usando los cebadores generales 5' AOX1 y 3' AOX1 como cebadores, la solución de bacterias clonadas identificadas correctamente se suministró a GenScript Corporation y se realizó secuenciación usando los cebadores generales 5' AOX1 y 3' AOX1. Como se verificó por la secuenciación, se cumplió lo esperado.

45

50

55

60

### 4.2 Construcción de plásmido de expresión de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-HSA

Excepto por el segmento génico de la proteína de fusión que se reemplazó por un gen de fusión de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-HSA, lo demás fue igual que en 4.1, y como se verificó por la secuenciación, se cumplió lo esperado.

65

### 4.3 Construcción de plásmido de expresión de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-HSA

Excepto por el segmento génico de la proteína de fusión que se reemplazó por un gen de fusión de análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-HSA, lo demás fue igual que en 4.1, y como se verificó por la secuenciación, se cumplió lo esperado.

4.4 Construcción de plásmido de expresión de análogo de GLP-1-E1-HSA

Excepto por el segmento génico de la proteína de fusión que se reemplazó por un gen de fusión de análogo de GLP-1-E1-HSA, lo demás fue igual que en 4.1, y como se verificó por la secuenciación, se cumplió lo esperado.

4.5 Construcción de plásmido de expresión de análogo de GLP-1-E2-HSA

Excepto por el segmento génico de la proteína de fusión que se reemplazó por un gen de fusión de análogo de GLP-1-E2-HSA, lo demás fue igual que en 4.1, y como se verificó por la secuenciación, se cumplió lo esperado.

4.6 Construcción de plásmido de expresión de análogo de GLP-1-E3-HSA

Excepto por el segmento génico de la proteína de fusión que se reemplazó por un gen de fusión de análogo de GLP-1-E3-HSA, lo demás fue igual que en 4.1, y como se verificó por la secuenciación, se cumplió lo esperado.

4.7 Construcción de plásmido de expresión de análogo de GLP-1-E4-HSA

Excepto por el segmento génico de la proteína de fusión que se reemplazó por un gen de fusión de análogo de GLP-1-E4-HSA, lo demás fue igual que en 4.1, y como se verificó por la secuenciación, se cumplió lo esperado.

4.8 Construcción de plásmido de expresión de análogo de GLP-1-E5-HSA

Excepto por el segmento génico de la proteína de fusión que se reemplazó por un gen de fusión de análogo de GLP-1-E5-HSA, lo demás fue igual que en 4.1, y como se verificó por la secuenciación, se cumplió lo esperado.

4.9 Construcción de plásmido de expresión de análogo de GLP-1-E6-HSA

Excepto por el segmento génico de la proteína de fusión que se reemplazó por un gen de fusión de análogo de GLP-1-E6-HSA, lo demás fue igual que en 4.1, y como se verificó por la secuenciación, se cumplió lo esperado.

Realización 2: construcción de bacterias genomanipuladas para expresión de la proteína de fusión

Se seleccionaron clones que contenían respectivamente los plásmidos de vector de expresión (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA/pPIC9, análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-HSA/pPIC9, análogo de GLP-1-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-HSA/pPIC9, análogo de GLP-1-E1-HSA/pPIC9, análogo de GLP-1-E2-HSA/pPIC9, análogo de GLP-1-E3-HSA/pPIC9, análogo de GLP-1-E4-HSA/pPIC9, análogo de GLP-1-E5-HSA/pPIC9 y análogo de GLP-1-E6-HSA/pPIC9. Los plásmidos de vector de expresión se extrajeron respectivamente, después se linealizaron respectivamente usando Sall. El ADN plasmídico linealizado se recuperó respectivamente mediante electroforesis en gel de agarosa y, finalmente, se transformaron respectivamente en células competentes de *Pichia pastoris* GS115 usando un método electrotransformación. Después de la descarga eléctrica, se añadió 1 ml de solución de sorbitol 1 M a la célula y se mezcló inmediatamente, después la solución se transfirió a un tubo de centrifuga de 1,5 ml y se puso a 30 °C durante 1,5 h, después la suspensión celular se recubrió sobre placas selectivas de RDB por cada 300 µl de suspensión celular. Las placas se cultivaron a 30 °C para el cultivo hasta que aparecieron colonias individuales. Las colonias positivas se transfirieron a placas de RDB recientes y se cultivaron durante 24 h, después las colonias individuales, correspondientes a cada proteína de fusión de análogo de GLP-1, que crecieron en las placas de RDB se seleccionaron respectivamente y se inocularon en 10 ml de medio de cultivo BMGY, se cultivaron durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La suspensión celular se colocó y el sobrenadante se descartó, después las células se resuspendieron usando 10 ml de BMMY (metanol al 2 %). Las células se indujeron durante 48 h a 30 °C y 250 rpm, después el sobrenadante se recogió por centrifugación para detectar la expresión de las proteínas de fusión mediante electroforesis en SDS-PAGE al 10 %. Los extremos N de las proteínas de fusión se secuenciaron si el tamaño de las bandas de electroforesis cumplía lo esperado, y los resultados de secuenciación que cumplían lo esperado significan que las cepas genomanipuladas con cada proteína de fusión de análogo de GLP-1 se construyeron satisfactoriamente.

Las condiciones específicas para linealizar los plásmidos fueron las siguientes: 60 µl de plásmido de vector de expresión, 2,5 µl de Sall, 20 µl de soluciones de tampón 10x (H) y se añadieron a 200 µl mediante ddH<sub>2</sub>O. La reacción se realizó durante 3 h en un baño de agua de temperatura constante a 37 °C.

Un método específico para preparar células comprendía las siguientes etapas: en primer lugar se preparan las colonias, se seleccionan colonias individuales de levadura, se inoculan las colonias individuales en un matraz triangular de 50 ml que contenía 5 ml de medio de cultivo YPD y se realiza cultivo a 30 °C y 250 rpm durante la noche; después se recogen y se inoculan 30 µl de cultivo en un matraz triangular de 250 ml que contenía 50 ml de medio de cultivo YPD y se realiza cultivo a 30 °C y 250 rpm durante la noche hasta que la DO600 alcanzó 1-1,5; se preenfria el cultivo celular en hielo durante 10 min, después se realiza centrifugación durante 5 min a 4 °C y 1500 xg, se descarta el

sobrenadante y se resuspende la precipitación de células con 40 ml de agua estéril preenfriada, se centrifugan, después se resuspende la precipitación de células con 25 ml de agua estéril preenfriada, se vuelven a centrifugar y se resuspende la precipitación de células con 5 ml de solución de sorbitol 1 M preenfriada, después se vuelven a centrifugar y se resuspende la precipitación de células con 80 µl de solución de sorbitol 1 M preenfriada.

Un método de electrotransformación específico comprendía las siguientes etapas: se mezclan uniformemente 10 µl de plásmidos linealizados con 80 µl de las células competentes, se transfiere la mezcla a una cubeta de electrotransformación preenfriada en hielo de 0,2 cm, se coloca la cubeta de electrotransformación en un baño de hielo durante 5 min y después se realiza la descarga eléctrica usando un voltaje de 1500 V.

#### Realización 3: preparación de proteínas de fusión de análogo de GLP-1

Con referencia al Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris* (Invitrogen Corporation), se inocularon cepas, que expresan cada una proteína de fusión de análogo de GLP-1, que se obtuvieron en la realización 2, en medio de cultivo YPD. El cultivo se realizó agitando a 30 °C y 220-280 rpm hasta que el peso en un húmedo de las células alcanzó aproximadamente 50 g/l, las células se inocularon en biorreacción (Biostat C10, Sartorius) mediante una dosificación de un 10 %. El cultivo se realizó durante 20 h a 30 °C, pH 5,0 y un 30 % de saturación de oxígeno disuelto. Después se suministró de forma continua metanol para iniciar la inducción. La saturación de oxígeno disuelto se controló al 40 %. La temperatura se redujo hasta 22 °C después de la inducción durante 4 h. La inducción se finalizó después de 50 h y el sobrenadante se recogió por centrifugación durante 15 min a 10 000 xg y se recogió el sobrenadante fermentado.

Se adoptó cromatografía de cuatro etapas de afinidad BLUE, hidrófoba de PHE, de intercambio iónico con DEAE y de exclusión molecular para la purificación. En primer lugar, el sobrenadante fermentado se diluyó tres veces usando solución de fosfato de sodio pH 7,0 20 mM, después la solución se pasó a través de la columna de cromatografía de afinidad Blue Sepharose Fast Flow (XK 50/20, GE healthcare), se realizó el equilibrado usando PBS y después se eluyó la proteína diana usando NaCl 2 M y solución de fosfato de sodio pH 6,5 20 mM. Se añadió (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la solución de proteína recogida para posibilitar que la concentración final alcanzara 0,5 M, la solución de proteína se pasó a través de una columna de cromatografía PHE Sepharose Fast Flow (XK 50/20, GE healthcare), se realizó equilibrado usando 0,6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y después la proteína se eluyó usando solución de tampón fosfato de sodio pH 6,5 5 mM. La proteína recogida se diluyó dos veces usando solución de tampón de fosfato de sodio pH 6,5 5 mM, después la solución se pasó a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico y la proteína diana se eluyó directamente usando PBS adoptando una columna de cromatografía DEAE Sepharose Fast Flow (XK 50/20, GE healthcare). Finalmente, se realizó desalación a través de una columna de cromatografía de gel grueso Sephadex G25 (XK 50/60, GE healthcare) para lograr el desplazamiento en la solución de tampón fosfato de sodio pH 6,5 5 mM. El sobrenadante de expresión y la proteína de fusión purificada se analizaron respectivamente usando SDS-PAGE no reductor. Como se muestra en la fig. 1, hubo una gran diferencia en la estabilidad de las proteínas de fusión de análogo de GLP-1 con diferentes estructuras durante la expresión, en la que la estabilidad de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA es la peor.

#### Realización 4: ensayo de actividad *in vitro*

De acuerdo con la bibliografía (Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, Mere L, Burres N, Feng L, Whitney M, Roemer K, Tsien RY. Science. 279 (5347): 84-8. (1998)), se construyeron células HEK-293 que portaban receptores de GLP-1 humanos y genes indicadores CRE-Luc, y se usó cultivo DMEM que contenía un 10 % de FBS de acuerdo con 50 000 células/pocillo/200 µl para la inoculación en una placa de cultivo celular de 96 pocillos Costar. En el segundo día después de la inoculación, se absorbió la solución de cultivo, se añadieron 50 µl de solución de cultivo DMEM sin suero de proteínas de fusión de análogo de GLP-1 diluidas por etapas que contenían IBMX 500 µM en cada pocillo, se realizó incubación durante 5-6 h, después se añadieron 50 µl de sustrato de luciferasa (sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™, Promega, E2620). La reacción se realizó durante 2 min, después la solución se transfirió a una placa de micropocillos toda blanca de 96 pocillos Costar. Los valores de fluorescencia se determinaron en un lector de microplaca ELISA multifuncional (sistema SpectraMax M5, Molecular Device). Se representó una curva de respuesta a dosis de acuerdo con los valores de fluorescencia y se determinó un valor de CE<sub>50</sub>. Tomando la actividad de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA como un 100 %, se calculó la actividad relativa de cada proteína de fusión. Los resultados fueron como se muestra en la tabla 1. La actividad *in vitro* de Gly<sub>4</sub>Ser como péptido de conexión fue sustancialmente similar a la de un análogo de GLP-1 como péptido de conexión; y, sin embargo, cuando se insertaba un segmento de secuencias (E1-E6) de acuerdo con la reivindicación 1 entre el análogo de GLP-1 y HSA, la actividad *in vitro* de la proteína de fusión se mejoraba en aproximadamente 7-10 veces.

Tabla 1

	Proteína de fusión	Actividad relativa (%)	Desviación típica
1	(análogo de GLP-1) <sub>2</sub> -HSA	100	17
2	análogo de GLP-1-(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>3</sub> -HSA	103	18
3	análogo de GLP-1-(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>4</sub> -HSA	108	22

	Proteína de fusión	Actividad relativa (%)	Desviación típica
4	análogo de GLP-1-E1-HSA	752	98
5	análogo de GLP-1-E2-HSA	823	124
6	análogo de GLP-1-E3-HSA	1108	89
7	análogo de GLP-1-E4-HSA	957	141
8	análogo de GLP-1-E5-HSA	1003	125
9	análogo de GLP-1-E6-HSA	763	99

#### Realización 5: análisis de estabilidad *in vitro*

Se recogió solución madre de proteína de fusión de análogo de GLP-1 de alta pureza, se añadieron cantidades apropiadas de cloruro de sodio, hidrogenofosfato de disodio y dihidrogenofosfato de disodio, se reguló el pH hasta 7,4 usando hidróxido de sodio o ácido clorhídrico y después se añadió agua para inyección para posibilitar que 1 ml de solución contuviera 5,0 mg de proteína de análogo de GLP-1, 9 mg de cloruro de sodio y 20  $\mu$ mol de fosfato. Las bacterias se retiraron usando una membrana de filtro de PVDF o PES de 0,22  $\mu$ m. La solución se envasó asépticamente en un frasco de penicilina en un entorno de clase-100. La muestra se almacenó en una caja de ensayo de estabilidad a 25 °C y se recogieron muestras respectivamente en el mes 0, 1 y 3 y se almacenaron en un refrigerador a -70 °C para la detección. Todas las muestras a analizar se combinaron y se detectó la pureza en SDS-PAGE y la actividad biológica celular. El método para detectar la pureza de SDS-PAGE fue como se describe en la realización 1 y la cantidad de carga de la muestra a detectar fue 10  $\mu$ g. Además, se cargaron 1  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g, 0,2  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g y 0,05  $\mu$ g de control propio. Se realizó barrido de densidad óptica para obtener una curva patrón, se calculó el contenido porcentual de cada proteína impura y finalmente se calculó la pureza de la proteína de fusión. El método para determinar la actividad *in vitro* fue como se describe en la realización 4, y se tomó la actividad de cada muestra en el mes cero como el 100 %. Antes de la determinación de la actividad, la muestra se separó usando una columna de tamiz molecular Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) para eliminar los segmentos degradados con masa molecular que era más pequeña de 10 000 Da. Para evitar la alteración de la misma hasta la determinación de la actividad. Los resultados son como se muestra en la tabla 2. Cuando el análogo de GLP-1 se insertaba como un péptido de conexión entre el análogo de GLP- y HSA, la tasa de conservación de actividad era la peor y la proteína de fusión era la más inestable.

Tabla 2

	Proteína de fusión	Pureza en SDS-PAGE (%)			Tasa de conservación de actividad (%)		
		0	1	3	0	1	3
1	(análogo de GLP-1) <sub>2</sub> -HSA	97,1	65,3	34,3	100	45,4	13,5
2	análogo de GLP-1-(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>3</sub> -HSA	97,3	84,3	67,3	100	79,0	47,2
3	análogo de GLP-1-(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>4</sub> -HSA	98,0	89,4	66,0	100	85,5	45,3
4	análogo de GLP-1-E1-HSA	97,5	93,4	77,9	100	97,6	60,6
5	análogo de GLP-1-E2-HSA	98,3	94,3	72,8	100	93,4	57,9
6	análogo de GLP-1-E3-HSA	97,9	95,1	77,3	100	91,7	49,8
7	análogo de GLP-1-E4-HSA	97,5	94,8	75,2	100	96,2	55,6
8	análogo de GLP-1-E5-HSA	98,4	95,7	81,2	100	93,3	47,2
9	análogo de GLP-1-E6-HSA	98,2	96,7	80,1	100	91,7	53,9

#### Realización 6: Análisis de estabilidad en suero

Se recogió solución madre de proteína de fusión de análogo de GLP-1 de alta pureza purificada y se añadió a suero de mono de acuerdo con una relación volumétrica de 1:25, se realizó filtración para eliminar las bacterias, la solución se envasó asépticamente en un frasco de penicilina y se realizó incubación a 37 °C. Se recogieron muestras en el día 0, 15 y 30 y se almacenaron en un refrigerador a -70 °C para la detección. Todas las muestras a analizar se combinaron y se determinó la concentración de proteína de fusión mediante un método de ELISA emparejado usando anticuerpos monoclonales anti-GLP-1 (Antibodyshop) como anticuerpos de captura y anticuerpo de cabra antialbúmina humana-HRP (Bethyl Laboratories) como anticuerpos de detección. Como los anticuerpos de captura se unieron a la parte del análogo de GLP-1 de la proteína de fusión y los anticuerpos de detección se unieron a la parte de la albúmina, la concentración de proteína de fusión determinada se correlacionó positivamente con el contenido de la parte no degradada. Los resultados fueron como se muestra en la tabla 3. Después de 30 días, la mayoría de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA en el suero de mono ya se había degradado y aproximadamente un 40 % de las otras muestras estaba conservado.

Tabla 3 Situación de cambio del contenido de proteína de fusión en suero con el tiempo

	Proteína de fusión	Contenido de proteína de fusión (%)		
		día 0	día 15	día 30
1	(análogo de GLP-1) <sub>2</sub> -HSA	100	37,4	17,8
2	análogo de GLP-1-(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>3</sub> -HSA	100	65,4	34,3
3	análogo de GLP-1-(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>4</sub> -HSA	100	69,3	37,6
4	análogo de GLP-1-E1-HSA	100	74,5	44,9
5	análogo de GLP-1-E2-HSA	100	72,0	41,2
6	análogo de GLP-1-E3-HSA	100	66,3	45,5
7	análogo de GLP-1-E4-HSA	100	73,2	48,2
8	análogo de GLP-1-E5-HSA	100	75,4	55,3
9	análogo de GLP-1-E6-HSA	100	76,9	45,1

Nota: la concentración determinada en el día 0 se tomó como el 100 %.

**Realización 7: ensayo de tolerancia de glucosa intraperitoneal en ratones**

5 En total se cogieron 32 ratones KM incluyendo 16 ratones hembra y 16 ratones macho y se alimentaron sin pienso, pero con agua únicamente durante la noche durante 18 h, y después se realizó inyección subcutánea de 1,0 mg/kg de HSA (grupo de control), (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA, análogo de GLP-1-E3-HSA y análogo de GLP-1-E6-HSA. Después de 1 hora y 8 horas después de la administración, se realizaron respectivamente ensayos de tolerancia de glucosa intraperitoneal (IPGTT), se realizó inyección intraperitoneal de 1,5 g/kg de glucosa y se recogió sangre antes (t=0) de inyección de glucosa y después de 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min y 120 min después de inyección de glucosa para determinar el contenido de glucosa en sangre (anализador bioquímico YSI2700). En comparación con el grupo de control (grupo de HSA), la glucosa en sangre de los ratones de los grupos de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA, análogo de GLP-1-E3-HSA y análogo de GLP-1-E6-HSA estaba obviamente reducida, y el área bajo la curva (ABC<sub>0-120min</sub>) de la glucosa en sangre era obviamente menor que la del grupo de control (los resultados fueron como se muestra en la tabla 4). Cuando el IPGTT se realizaba después de 1 hora tras la administración, los niveles de glucosa en sangre en el punto temporal respectivo entre los tres grupos eran similares, las áreas bajo la curva (ABC<sub>0-120min</sub>) de la glucosa en sangre también eran similares, y no existían diferencias notables (P>0,05) entre los grupos; y, sin embargo, cuando se realizaba IPGTT después de 8 horas tras la administración, los niveles de glucosa en sangre de los ratones de los grupos de análogo de GLP-1-E3-HSA y análogo de GLP-1-E6-HSA a los 10-30 min eran obviamente inferiores a los del grupo de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA, y la ABC<sub>0-120min</sub> de la glucosa en sangre también era obviamente inferior a la del grupo de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA (P<0,01). Los resultados mostraron que tanto (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA como análogo de GLP-1-E3-HSA podían reducir de forma eficaz la glucosa en sangre en ayunas de los ratones y tenían una característica de larga acción, pero en comparación con el grupo de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA, los grupos de análogo de GLP-1-E3-HSA y análogo de GLP-1-E6-HSA tenían efectos reductores de glucosa en sangre más notables y continuos.

Tabla 4 Áreas bajo la curva (ABC<sub>0-120min</sub>) de la glucosa en sangre durante IPGTT a 1 h y 8 h después de la administración de dosis única a ratones KM

Tiempo	Animal grupo	Animal										Media	ETM
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1 h	HSA	818	713	724	778	817	1028	1220	688	1005	1096	889	184
	análogo de GLP-1) <sub>2</sub> -HSA	544	692	679	640	528	727	589	763	671	649	648	76
	análogo de GLP-1-E3-HSA	775	645	596	501	563	520	690	688	553	643	617	86
	análogo de GLP-1-E6-HSA	654	731	638	602	554	498	512	620	578	621	601	69
8 h	HSA	735	746	772	831	883	717	882	933	859	854	821	74
	análogo de GLP-1) <sub>2</sub> -HSA	691	585	762	570	580	656	705	430	496	642	612	100
	análogo de GLP-1-E3-HSA	447	528	525	469	562	348	515	624	527	358	490	87
	análogo de GLP-1-E6-HSA	502	485	445	412	450	520	471	465	542	399	469	45

**Realización 8: ensayo farmacodinámico de proteína de fusión de análogo de GLP-1 después de inyección subcutánea de una única dosis a macaco de la India normal**

Se realizó inyección subcutánea de una única dosis de 0,5 mg/kg de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA o análogo de GLP-1-E3-HSA a un macaco de la India, se realizaron ensayos de glucosa intravenosa por etapas después de 24 h y 96 h, se realizó inyección intravenosa de solución de glucosa (solución de dextrosa al 20 %, 200 mg/ml) de forma continua durante 20 min de acuerdo con 10 mg/kg/min (3,0 ml/kg/h), y después se administró solución de glucosa de forma continua durante 20 min de acuerdo con 25 mg/kg/min (7,5 ml/kg/h). Se adquirió sangre después de 0, 10 min, 20 min,

30 min y 40 min tras inyección de glucosa para determinar la glucosa y la insulina en sangre. Se usó analizador bioquímico YSI2700 para determinar la glucosa en sangre y se usó ensayo de inmunoabsorción enzimática (kit de ELISA de insulina, DRG International, Inc.) para determinar la insulina. No hubo diferencia notable en la glucosa en sangre entre los dos grupos en el punto temporal respectivo después de un día tras la administración (los resultados se muestran en las fig. 2A-D). Hubo una diferencia notable ( $P < 0,05$  o  $P < 0,01$ ) entre los grupos a 10 min, 30 min y 40 min tras 4 días después de la administración; y hubo una diferencia notable ( $P < 0,01$ ) en la insulina entre los grupos en los puntos temporales de 20 min y 40 min tras 1 día y 4 días después de la administración. Los resultados mostraron que, en comparación con (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA, el análogo de GLP-1-E3-HSA podía promover mejor la secreción de insulina y reducir el nivel de glucosa en sangre en el ensayo de glucosa intravenosa por etapas realizado al macaco de la India normal.

#### Realización 9: investigación farmacocinética después de administración de una única dosis a macaco cangrejero

Se realizó respectivamente inyección subcutánea de una única dosis de 0,5 mg/kg de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA y análogo de GLP-1-E3-HSA a macacos cangrejeros, se adquirió respectivamente sangre antes de la administración ( $t=0$ ) y después de 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h y 216 h tras la administración, se separó el suero, se realizó crioconservación a  $-80$  °C y después el suero se combinó y se detectó. Se determinó la concentración de proteína de fusión en el suero usando anticuerpos monoclonales anti-GLP-1 (Antibodyshop) como anticuerpos de captura y anticuerpo de cabra antialbúmina humana-HRP (Bethyl Laboratories) como anticuerpos de detección (véase la fig. 3), y se calcularon los parámetros farmacocinéticos (véase la tabla 5). La investigación mostró que el periodo de semivida del análogo de GLP-1-E3-HSA a 0,5 mg/kg en el organismo del macaco cangrejero era de 102 h (aproximadamente 4 días) y el periodo de semivida del (análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA era de 60 h (2,5 días).

Tabla 5

Parámetros	(análogo de GLP-1) <sub>2</sub> -HSA	análogo de GLP-1-E3-HSA
C <sub>máx</sub> (ng/ml)	3954	4452
T <sub>máx</sub> (h)	24	24
ABC <sub>0-∞</sub> (ng/ml*h)	356210	516613
T <sub>1/2</sub> (h)	60	102
CL (ml/h/kg)	1,404	0,968

#### Realización 10: inmunogenicidad después de administración subcutánea repetitiva a macaco cangrejero

Se realizó semanalmente inyección subcutánea de 1 mg/kg (de análogo de GLP-1)<sub>2</sub>-HSA y análogo de GLP-1-E3-HSA a macacos cangrejeros, y la administración se realizó de forma continua durante 3 meses. Se adquirió respectivamente sangre antes de la administración ( $t=0$ ) y después de 1 mes, 2 meses y 3 meses tras la administración, se separó el suero, se realizó crioconservación a  $-80$  °C y después el suero se combinó y se detectó. Se determinaron anticuerpos de mono antiproteína de fusión que se producían posiblemente usando ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Las proteínas de fusión correspondientes se usaron como sustancias incrustantes, se añadieron muestras de suero a detectar de diferente dilución y se determinó el título de los anticuerpos usando anticuerpo de ratón anti-IgG de mono como anticuerpos de detección. Simultáneamente, en condiciones de determinación similares, se añadió seroalbúmina humana como antagonista a las muestras de suero a detectar (concentración final de 60  $\mu$ M) para analizar adicionalmente la especificidad de los anticuerpos producidos (véase la tabla 6). Los resultados de investigación muestran que, después de administración repetitiva, se producían anticuerpos por ambos, el título más alto alcanzaba 1:6400 y las tendencias y los títulos de los anticuerpos producidos por ambos eran sustancialmente coherentes. Se añadió adicionalmente HSA al suero para el análisis antagonista, los resultados mostraron que el título del suero disminuía obviamente bajo la existencia de HSA y se indica que los anticuerpos producidos estaban antagonizados sustancialmente por HSA. Por lo tanto, indicaron que la mayoría de los anticuerpos producidos después de la inyección repetitiva de proteína de fusión a macacos estaban dirigidos a la parte de HSA en la proteína de fusión y no se producían anticuerpos antianálogo de GLP-1.

Tabla 6

Proteína de fusión	N.º de animal	Título de anticuerpo antiproteína de fusión			Título de anticuerpo antianálogo de GLP-1				
		Antes de la administración	1 mes	2 meses	3 meses	Antes de la administración	1 mes	2 meses	3 meses
(análogo de GLP-1) <sub>2</sub> -HSA	1	N.D.	N.D.	1:1600	1:6400	N.D.	N.D.	N.D.	1:100
	2	N.D.	1:100	1:6400	1:6400	N.D.	N.D.	N.D.	1:200
	3	N.D.	N.D.	1:1600	1:1600	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
análogo de GLP-1-E3-HSA	4	N.D.	N.D.	N.D.	1:100	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	5	N.D.	1:100	1:6400	1:6400	N.D.	N.D.	1:100	N.D.
	6	N.D.	N.D.	1:1600	1:1600	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Nota: título de anticuerpo < 1:100 se definió como no detectado (N.D.).

Las realizaciones mencionadas anteriormente se usan únicamente para describir de forma ejemplar el principio y las eficacias de la presente invención en lugar de limitar la presente invención. Un experto en la materia puede hacer modificaciones o cambios a las realizaciones mencionadas anteriormente sin alejarse del espíritu y el alcance de la presente invención.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> T-mab Biopharma
- <120> Proteína de fusión de análogo de GLP-1 y método de preparación y aplicación de la misma
- 10 <130> 130883
- <160> 28
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 28
- 15 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

```

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

20

- <210> 2
- <211> 585
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 2

ES 2 713 378 T3

Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu
1				5					10					15	
Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln
			20					25					30		
Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu
		35					40					45			
Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys
	50					55					60				
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu
65					70					75					80
Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro
				85					90					95	
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu
			100					105					110		
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His
		115					120					125			
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg
	130					135					140				
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg
145					150					155					160
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala
				165					170					175	
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser
			180					185					190		
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu
		195					200					205			
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro
	210					215					220				
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys
225					230					235					240
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp
				245					250					255	
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser
			260					265					270		
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His
		275					280					285			
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser
	290					295					300				
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala
305					310					315					320

ES 2 713 378 T3

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg  
 325 330 335  
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
 340 345 350  
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu  
 355 360 365  
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
 370 375 380  
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
 405 410 415  
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
 420 425 430  
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
 435 440 445  
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
 450 455 460  
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
 465 470 475 480  
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
 485 490 495  
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
 500 505 510  
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
 515 520 525  
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
 530 535 540  
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
 545 550 555 560  
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
 565 570 575  
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 580 585

<210> 3

<211> 627

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

<400> 3

10

ES 2 713 378 T3

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

ES 2 713 378 T3

				165					170					175		
Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	
			180					185					190			
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	
		195					200					205				
Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	
	210					215					220					
Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	
225					230						235				240	
Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	
			245						250					255		
Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	
			260					265					270			
Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	
	275					280						285				
His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	
	290					295					300					
Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	
305				310						315					320	
Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	
			325						330				335			
Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	
		340						345					350			
Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	
	355						360					365				
Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	
	370					375					380					
Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	
385					390					395					400	
Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	
			405						410				415			
Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	
		420						425				430				
Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	
	435						440					445				
Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	
	450					455					460					
Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	
465					470					475					480	
Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	
			485						490				495			
Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	
		500						505					510			
Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	
	515						520					525				
Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	
	530					535					540					
Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	
545					550					555					560	
Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	
			565						570				575			
His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	
			580					585					590			
Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	
	595						600					605				
Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	
	610					615					620					
Leu	Gly	Leu														
625																

<210> 4  
 <211> 632  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 713 378 T3

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

<400> 4

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1      5      10      15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Ala
20      25      30
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser Ser Gly Gly Asp
35      40      45
Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
50      55      60
Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
65      70      75      80
Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
85      90      95
Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
100     105     110
Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
115     120     125
Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
130     135     140
Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
145     150     155     160
Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
165     170     175
Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
180     185     190
His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
195     200     205
Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
210     215     220
Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
225     230     235     240
Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
245     250     255
Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
260     265     270
Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
275     280     285
His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
290     295     300
Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
305     310     315     320
Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
325     330     335
Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
340     345     350
Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
355     360     365
Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
370     375     380
His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
385     390     395     400
Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
405     410     415
Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
420     425     430
Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
435     440     445
Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
450     455     460
Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val

```

ES 2 713 378 T3

465					470					475				480	
Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala
				485					490					495	
Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu
			500					505					510		
Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu
		515					520					525			
Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr
	530					535					540				
Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile
545					550					555				560	
Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu
			565					570						575	
Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys
			580					585					590		
Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala
		595					600					605			
Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala
610						615					620				
Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu								
625					630										

<210> 5

<211> 639

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

<400> 5

10

ES 2 713 378 T3

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		35					40					45			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg
	50					55					60				
Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala
65					70					75					80
Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu
				85					90					95	
Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser
			100					105					110		
Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu
		115					120					125			
Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys
	130					135					140				
Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys
145					150					155					160
Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val
				165					170					175	
Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	
			180					185				190			
Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu
		195					200					205			
Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln
	210					215					220				
Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg
225					230					235					240
Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser
				245					250					255	
Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg
			260					265					270		

ES 2 713 378 T3

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu  
 275 280 285  
 Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu  
 290 295 300  
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu  
 305 310 315 320  
 Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro  
 325 330 335  
 Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met  
 340 345 350  
 Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp  
 355 360 365  
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe  
 370 375 380  
 Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala  
 405 410 415  
 Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys  
 420 425 430  
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu  
 435 440 445  
 Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg  
 450 455 460  
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val  
 465 470 475 480  
 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu  
 485 490 495  
 Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn  
 500 505 510  
 Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr  
 515 520 525  
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala  
 530 535 540  
 Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr  
 545 550 555 560  
 Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln  
 565 570 575  
 Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys  
 580 585 590  
 Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe  
 595 600 605  
 Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu  
 610 615 620  
 Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 625 630 635

<210> 6  
 <211> 84  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6

5

cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaaag  
 gaattcattg cttggctggt gaaa

60  
84

10

<210> 7  
 <211> 1758  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 7

15

ES 2 713 378 T3

gatgcacaca	agagtgaggt	tgctcatcgg	tttaaagatt	tgggagaaga	aaatttcaaa	60
gccttggtgt	tgattgcctt	tgctcagtat	cttcagcagt	gtccatttga	agatcatgta	120
aaattagtga	atgaagtaac	tgaatttgca	aaaacatgtg	ttgctgatga	gtcagctgaa	180
aattgtgaca	aatcacttca	tacccttttt	ggagacaaat	tatgcacagt	tgcaactctt	240
cgtgaaacct	atggtgaaat	ggctgactgc	tgtgcaaaac	aagaacctga	gagaaatgaa	300
tgcttcttgc	aacacaaaga	tgacaaccca	aacctcccc	gattggtgag	accagaggtt	360
gatgtgatgt	gcactgcttt	tcatgacaat	gaagagacat	ttttgaaaa	atacttatat	420
gaaattgccca	gaagacatcc	ttacttttat	gccccggaac	tccttttctt	tgctaaaagg	480
tataaagctg	cttttacaga	atgttgccaa	gctgctgata	aagctgcctg	cctgttgcca	540
aagctcgatg	aacttcggga	tgaaggggaag	gcttcgtctg	ccaaacagag	actcaagtgt	600
gccagtctcc	aaaaatttgg	agaaagagct	ttcaaagcat	gggcagtgc	tcgcctgagc	660
cagagatttc	caaagctga	gtttgcagaa	gtttccaagt	tagtgacaga	tcttaccaa	720
gtccacacgg	aatgctgcca	tggagatctg	cttgaatgtg	ctgatgacag	ggcggacctt	780
gccaagtata	tctgtgaaaa	tcaagattcg	atctccagta	aactgaagga	atgctgtgaa	840
aaacctctgt	tggaaaaatc	ccactgcatt	gccgaagtgg	aaaatgatga	gatgcctgct	900
gacttgccctt	cattagctgc	tgattttggt	gaaagtaagg	atgtttgcaa	aaactatgct	960
gaggcaagg	atgtcttctt	gggcatgttt	ttgtatgaat	atgcaagaag	gcatcctgat	1020
tactctgtcg	tgctgctgct	gagacttgcc	aagacatatg	aaaccactct	agagaagtgc	1080
tgtgccgctg	cagatcctca	tgaatgctat	gccaaagtgt	tcgatgaatt	taaacctctt	1140
gtggaagagc	ctcagaattt	aatcaaacia	aattgtgagc	tttttgagca	gcttggagag	1200
tacaaattcc	agaatgcgct	attagttcgt	tacaccaaga	aagtaccca	agtgtaact	1260
ccaactcttg	tagaggtctc	aagaaacctc	ggaaaagtgg	gcagcaaatg	ttgtaaacat	1320
cctgaagcaa	aaagaatgcc	ctgtgcagaa	gactatctat	ccgtggtcct	gaaccagtta	1380
tgtgtgttgc	atgagaaaa	gccagtaagt	gacagagtca	caaaatgctg	cacagagtcc	1440
ttggtgaaca	ggcgaccatg	cttttcagct	ctggaagtgc	atgaaacata	cgttcccaaa	1500
gagtttaatg	ctgaaacatt	caccttccat	gcagatatat	gcacactttc	tgagaaggag	1560
agacaaatca	agaaacaaac	tgcacttggt	gagcttgtga	aacacaagcc	caaggcaaca	1620
aaagagcaac	tgaaagctgt	tatggatgat	ttcgcagctt	ttgtagagaa	gtgctgcaag	1680
gctgacgata	aggagacctg	ctttgccgag	gagggtaaaa	aacttggtgc	tgcaagtcaa	1740
gctgccttag	gcttataa					1758

<210> 8

<211> 1884

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

<400> 8

10

ES 2 713 378 T3

cacggcgaag	ggacctttac	cagtgatgta	agttcttatt	tggaagagca	agctgccaaag	60
gaattcattg	cttggctggt	gaaaggtggt	ggatcttctc	caccaccagg	tggtggaggc	120
tcttcagatg	cacacaagag	tgaggttgct	catcggttta	aagatttggg	agaagaaaat	180
ttcaaagcct	tggtggtgat	tgcttttgct	cagtatcttc	agcagtgtcc	at ttgaagat	240
catgtaaaat	tagtgaatga	agtaactgaa	tttgcaaaaa	catgtgttgc	tgatgagtca	300
gctgaaaatt	gtgacaaatc	acttcatacc	ctttttggag	acaaattatg	cacagttgca	360
actcttcgtg	aaacctatgg	tgaaatggct	gactgctgtg	caaaacaaga	acctgagaga	420
aatgaatgct	tcttgcaaca	caaagatgac	aacccaaacc	tcccccgatt	ggtgagacca	480
gaggttgatg	tgatgtgcac	tgcttttcat	gacaatgaag	agacattttt	gaaaaaatac	540
ttatatgaaa	ttgccagaag	acatccttac	ttttatgccc	cggaactcct	tttctttgct	600
aaaaggata	aagctgcttt	tacagaatgt	tgccaagctg	ctgataaagc	tgctgcctg	660
ttgccaagc	tcgatgaact	tcgggatgaa	gggaaggctt	cgtctgcaa	acagagactc	720
aagtgtcca	gtctccaaa	atttgagaaa	agagctttca	aagcatgggc	agtatctgc	780
ctgagccaga	gatttcccaa	agctgagttt	gcagaagttt	ccaagttagt	gacagactct	840
accaaagtcc	acacggaatg	ctgccatgga	gatctgcttg	aatgtgctga	tgacagggcg	900
gaccttgcca	agtatatctg	tgaaaatcaa	gattcgatct	ccagtaaact	gaaggaatgc	960
tgtgaaaaac	ctctgttggg	aaaatcccac	tgcatgtgcc	aagtggaaaa	tgatgagatg	1020
cctgctgact	tgcttcatt	agctgctgat	tttgttgaaa	gtaaggatgt	ttgcaaaaaac	1080
tatgctgagg	caaaggatgt	cttcctgggc	atgtttttgt	atgaatatgc	aagaaggcat	1140
cctgattact	ctgtcgtgct	gctgctgaga	cttgccaaga	catatgaaac	cactctagag	1200
aagtgctgtg	ccgctgcaga	tcctcatgaa	tgctatgcca	aagtgttcga	tgaatttaaa	1260
cctcttgtgg	aagagcctca	gaatttaatc	aaacaaaatt	gtgagctttt	tgagcagctt	1320
ggagagtaca	aattccagaa	tgcgctatta	gttcggtaca	ccaagaaaag	accccaagtg	1380
tcaactcaa	ctctttaga	ggtctcaaga	aacctaggaa	aagtgggcag	caaagtgtgt	1440
aaacatcctg	aagcaaaaag	aatgccctgt	gcagaagact	atctatccgt	ggtcctgaac	1500
cagttatgtg	tgttgcatga	gaaaacgcca	gtaagtgaca	gagtcacaaa	atgctgcaca	1560
gagtccttgg	tgaacaggcg	accatgcttt	tcagctctgg	aagtcgatga	aacatacgtt	1620
cccaaagagt	ttaatgctga	aacattcacc	ttccatgcag	atatatgcac	actttctgag	1680
aaggagagac	aaatcaagaa	acaaaactgca	cttgttgagc	ttgtgaaaca	caagcccaag	1740
gcaacaaaag	agcaactgaa	agctgttatg	gatgatttctg	cagctttttgt	agagaagtgc	1800
tgcaaggctg	acgataagga	gacctgcttt	gccgaggagg	gtaaaaaact	tgttgctgca	1860
agtcaagctg	ccttaggctt	ataa				1884

<210> 9

<211> 1899

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

<400> 9

10

ES 2 713 378 T3

cacggcgaag	ggacctttac	cagtgatgta	agttcttatt	tggaagagca	agctgccaaag	60
gaattcattg	cttggctggt	gaaagggcgg	ggtgctccac	caccaccacc	accaccacca	120
ccaccatctt	ccggaggcgg	tgatgcacac	aagagtggag	ttgctcatcg	gtttaaagat	180
ttgggagaag	aaaatttcaa	agccttgggt	ttgattgcct	ttgctcagta	tcttcagcag	240
tgtccatttg	aagatcatgt	aaaatttagtg	aatgaagtaa	ctgaatttgc	aaaaacatgt	300
gttgctgatg	agtcagctga	aaattgtgac	aatcacttc	ataccctttt	tggagacaaa	360
ttatgcacag	ttgcaactct	tcgtgaaacc	tatggtgaaa	tggctgactg	ctgtgcaaaa	420
caagaacctg	agagaaatga	atgcttcttg	caacacaaaag	atgacaaccc	aaacctcccc	480
cgattggtga	gaccagaggt	tgatgtgatg	tgcactgctt	ttcatgacaa	tgaagagaca	540
tttttgaaaa	aatacttata	tgaaattgcc	agaagacatc	cttactttta	tgccccggaa	600
ctccttttct	ttgctaaaaag	gtataaaagct	gcttttacag	aatgttgccca	agctgctgat	660
aaagctgcct	gcctgttgcc	aaagctcgat	gaacttcggg	atgaagggaa	ggcttcgtct	720
gccaaacaga	gactcaagtg	tgccagctctc	caaaaatttg	gagaaagagc	tttcaaagca	780
tgggcagtag	ctcgcctgag	ccagagattt	cccaaagctg	agtttgacag	agtttccaag	840
ttagtgcacg	atcttaccaa	agtccacacg	gaatgctgcc	atggagatct	gcttgaatgt	900
gctgatgaca	gggcggacct	tgccaagtat	atctgtgaaa	atcaagattc	gatctccagt	960
aaactgaagg	aatgctgtga	aaaacctctg	ttggaaaaat	cccactgcat	tgccgaagtg	1020
gaaaatgatg	agatgcctgc	tgacttgctt	tcattagctg	ctgattttgt	tgaaagtaag	1080
gatgtttgca	aaaactatgc	tgaggcaaag	gatgtcttcc	tgggcatggt	tttgtatgaa	1140
tatgcaagaa	ggcatcctga	ttactctgtc	gtgctgctgc	tgagacttgc	caagacatat	1200
gaaaccactc	tagagaagtg	ctgtgccgct	gcagatcctc	atgaatgcta	tgccaaagtg	1260
ttcgatgaat	ttaaacctct	tgtggaagag	cctcagaatt	taatcaaaca	aaattgtgag	1320
ctttttgagc	agcttggaga	gtacaaattc	cagaatgcgc	tattagttcg	ttacaccaag	1380
aaagtacccc	aagtgtcaac	tccaactctt	gtagaggtct	caagaaacct	aggaaaagtg	1440
ggcagcaaat	gttgtaaaaca	tcctgaagca	aaaagaatgc	cctgtgcaga	agactatcta	1500
tccgtggtcc	tgaaccagtt	atgtgtgttg	catgagaaaa	cgccagtaag	tgcagagctc	1560
acaaaatgct	gcacagagtc	cttgggtgaac	aggcgacct	gcttttcagc	cttgggaagtc	1620
gatgaaacat	acgttcccaa	agagtttaat	gctgaaacat	tcaccttcca	tgcagatata	1680
tgcacacttt	ctgagaagga	gagacaaatc	aagaaacaaa	ctgcacttgt	tgagcttgtg	1740
aaacacaagc	ccaaggcaac	aaaagagcaa	ctgaaagctg	ttatggatga	tttcgcagct	1800
tttgtagaga	agtgtgcaa	ggctgacgat	aaggagacct	gctttgccga	ggagggtaaa	1860
aaacttgttg	ctgcaagtca	agctgcctta	ggcttataa			1899

<210> 10

<211> 1920

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia codificante de nucleótidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1

<400> 10

10

cacggcgaag	ggacctttac	cagtgatgta	agttcttatt	tggaagagca	agctgccaaag	60
gaattcattg	cttggctggt	gaaagggcgg	ggtgctccac	caccaccacc	accaccacca	120
ggtggaggct	ctggagggtg	agggtccgga	ggcgggggtt	cagatgcaca	caagagtggag	180
gttgctcatc	ggtttaaaga	tttgggagaa	gaaaatttca	aagccttggg	gttgattgcc	240
tttgctcagt	atcttcagca	gtgtccattt	gaagatcatg	taaaattagt	gaatgaagta	300
actgaatttg	caaaaacatg	tgttgctgat	gagtcagctg	aaaattgtga	caaatcactt	360
catacccttt	ttggagacaa	attatgcaca	gttgcaactc	ttcgtgaaac	ctatggtgaa	420
atggctgact	gctgtgcaaa	acaagaacct	gagagaaatg	aatgcttctt	gcaacacaaa	480
gatgacaacc	caaacctccc	ccgattgggt	agaccagag	ttgatgtgat	gtgcactgct	540
tttcatgaca	atgaagagac	atttttgaaa	aaatacttat	atgaaattgc	cagaagacat	600
ccttactttt	atgccccgga	actccttttc	tttgctaaaa	ggtataaagc	tgcttttaca	660

ES 2 713 378 T3

```

gaatgttgcc aagctgctga taaagctgcc tgcctggtgc caaagctcga tgaacttcgg 720
gatgaaggga aggcttcgct tgccaaacag agactcaagt gtgccagtct ccaaaaattt 780
ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct 840
gagtttgtag aagtttccaa gtttagtgaca gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc 900
catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac agggcggacc ttgccaaagta tatctgtgaa 960
aatcaagatt cgatctccag taaactgaag gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa 1020
tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct 1080
gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc 1140
ctgggcatgt ttttztatga atatgcaaga aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg 1200
ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct 1260
catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat 1320
ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag cagcttggag agtacaatc ccagaatgct 1380
ctattagttc gttacaccaa gaaagtacct caagtgtcaa ctccaactct tgtagaggtc 1440
tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg 1500
ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa 1560
acgccagtaa gtgacagagt cacaaaatgc tgcacagagt ccttggtgaa caggcgacca 1620
tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca 1680
ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt tctgagaagg agagacaaat caagaacaa 1740
actgcacttg ttgagcttgt gaaacacaag cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct 1800
gttatggatg atttcgcagc tttttagtag aagtgctgca aggctgacga taaggagacc 1860
tgctttgccc aggagggtaa aaaacttggt gctgcaagtc aagctgcctt aggcattata 1920

```

5  
 <210> 11  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> péptido de conexión  
 <400> 11

10  
 Gly Gly Gly Ser Ser Pro Pro Pro Gly Gly Gly Ser Ser  
 1 5 10

15  
 <210> 12  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> péptido de conexión  
 <400> 12

20  
 Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ser Pro Pro Pro Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ser  
 20

25  
 <210> 13  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> péptido de conexión  
 <400> 13

30  
 Gly Gly Gly Ala Pro Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly

35  
 <210> 14  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> péptido de conexión

ES 2 713 378 T3

<400> 14

Ala Gly Gly Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Pro Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Pro Gly Gly Gly Ser  
 20

5 <210> 15  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> péptido de conexión  
 <400> 15

Gly Gly Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Pro Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

15 <210> 16  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> péptido de conexión  
 <400> 16

Gly Gly Gly Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 20 25

25 <210> 17  
 <211> 187  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> segmento génico de (análogo de GLP-1)<sub>2</sub> con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3'<sub>222</sub>  
 <400> 17

cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaaag 60  
 gaattcattg cttggctggt gaaacacggc gaagggacct ttaccagtga tgtaagttct 120  
 tatttggaag agcaagctgc caaggaattc attgcttggc tggtgaaaga tgcacacaag 180  
 agtgagg 187

35 <210> 18  
 <211> 148  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> segmento génico de (análogo de GLP-1)-(Gly4Ser)<sub>3</sub> con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3'<sub>222</sub>  
 <400> 18

cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaaag 60  
 gaattcattg cttggctggt gaaagggtggt ggaggctctg gaggtggagg ttccggaggc 120  
 gggggttcag atgcacacaa gagtgagg 148

45 <210> 19  
 <211> 163  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 50 <223> segmento de fusión de (análogo de GLP-1)-(Gly4Ser)<sub>4</sub> con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3'<sub>222</sub>  
 <400> 19

ES 2 713 378 T3

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaaggtggg ggaggctctg gtggaggagg ctctggaggg 120**  
**ggaggttccg gaggcggggg ttcagatgca cacaagagtg agg 163**

<210> 20  
 <211> 145  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> segmento de fusión de (análogo de GLP-1)-E1 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3\222  
 <400> 20

5

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaaggtggg ggatcttctc caccaccagg tggaggaggc 120**  
**tcttcagatg cacacaagag tgagg 145**

<210> 21  
 <211> 175  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> segmento de fusión de (análogo de GLP-1)-E2 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3\222  
 <400> 21

10

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaaggtgga ggctcttcag gtggaggctc ttcaccacca 120**  
**ccagctggtg gaggctcttc aggtggaggc tcttcagatg cacacaagag tgagg 175**

<210> 22  
 <211> 160  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> segmento de fusión de (análogo de GLP-1)-E3 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3\222  
 <400> 22

15

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaagggcgg ggtgctccac caccaccacc accaccacca 120**  
**ccaccatctt ccggaggcgg tgatgcacac aagagtgagg 160**

<210> 23  
 <211> 175  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> segmento de fusión de (análogo de GLP-1)-E4 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3\222  
 <400> 23

20

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaagctggc gggggtgctg ctggaggcgg gtcttctggc 120**  
**gggggtccac caccaccacc aggaggcggg ggttcagatg cacacaagag tgagg 175**

<210> 24  
 <211> 148  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> segmento de fusión de (análogo de GLP-1)-E5 con un segmento de fusión de HSA en el extremo 3\222  
 <400> 24

25

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaaggtgga tcttctgggctg ctccaccacc accaggaggc 120**  
**gggggtccag atgcacacaa gagtgagg 148**

30

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaaggtgga tcttctgggctg ctccaccacc accaggaggc 120**  
**gggggtccag atgcacacaa gagtgagg 148**

35

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaaggtgga tcttctgggctg ctccaccacc accaggaggc 120**  
**gggggtccag atgcacacaa gagtgagg 148**

40

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaaggtgga tcttctgggctg ctccaccacc accaggaggc 120**  
**gggggtccag atgcacacaa gagtgagg 148**

45

**cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag 60**  
**gaattcattg cttggctggg gaaaggtgga tcttctgggctg ctccaccacc accaggaggc 120**  
**gggggtccag atgcacacaa gagtgagg 148**

50



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína de fusión de análogo de GLP-1, caracterizada por que una estructura de la proteína de fusión es análoga de GLP-1-péptido conector-seroalbúmina humana, la secuencia de aminoácidos del péptido conector es una cualquiera de las SEQ ID NO. 11-16, un extremo N del péptido conector está conectado con un extremo C del análogo de GLP-1 mediante un enlace peptídico y un extremo C del péptido conector está conectado con un extremo N de la seroalbúmina humana mediante un enlace peptídico, en la que el análogo de GLP-1 es uno cualquiera de los siguientes:
- 10 a) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 1;
- b) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 1 en que la Gly de la secuencia en la posición 2 está reemplazada por Ala, Ser o Cys y/o Glu en la posición 3 está reemplazada por Asp, Gli, Ser, Cys Thr, Asp, Gln, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met o Phe y/o Gly en la posición 4 está reemplazada por Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met o Phe y/o Asp en la posición 9 está reemplazada por Glu y/o Val en la posición 10 está reemplazada por Leu o Tyr y/o Ser en la posición 12 está reemplazada por Lys y/o Glu en la posición 15 está reemplazada por Asp y/o Ala en la posición 18 está reemplazada por Arg y/o Lys en la posición 20 está reemplazada por Gly, Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe o Arg y/o Lys en la posición 28 está reemplazada por Gly, Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe o Arg sin cambiar la actividad de la misma;
- 15 c) que comprende 2 o 3 secuencias repetitivas del análogo de GLP-1 de a) o b), o que comprende 2 o 3 secuencias repetitivas de un GLP-1; y
- 20 d) que es exendina-4
- o en la que una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de análogo de GLP-1 se selecciona de las SEQ ID NO. 3-5.
- 25 2. La proteína de fusión de análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que una secuencia de aminoácidos de la seroalbúmina humana es la SEQ ID NO. 2 o la secuencia de la SEQ ID NO. 2 en que la Cys de la secuencia en la posición 34 está reemplazada por Ser y/o Leu en la posición 407 está reemplazada por Ala y/o Leu en la posición 408 está reemplazada por Val y/o Val en la posición 409 está reemplazada por Ala y/o Arg en la posición 410 está reemplazada por Ala y/o Lys en la posición 413 está reemplazada por Gln sin cambiar la actividad de la misma.
- 30 3. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que una secuencia del polinucleótido se selecciona de las SEQ ID NO. 8-10.
- 35 5. Un método para preparar la proteína de fusión de análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, comprendiendo el método las siguientes etapas: construir un vector de expresión que contiene una secuencia génica de la proteína de fusión de análogo de GLP-1, después transformar el vector de expresión en una célula hospedadora para la expresión inducida, y separar y obtener la proteína de fusión de los productos de expresión.
- 40 6. El método para preparar la proteína de fusión de análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el vector de expresión es pPIC9; y la célula hospedadora es *Pichia pastoris*.
- 45 7. El método para preparar la proteína de fusión de análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que un método para preparar y obtener la proteína de fusión de los productos de expresión comprende la etapa de separar y obtener la proteína de fusión adoptando un método cromatográfico de tres etapas que una cromatografía de afinidad, cromatografía hidrófoba y cromatografía de intercambio iónico.
- 50 8. La proteína de fusión de análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso como medicamento.
9. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes y enfermedades relacionadas con diabetes, que contiene la proteína de fusión de análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55 10. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes y enfermedades relacionadas con diabetes, que contiene la proteína de fusión de análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 60 11. La proteína de fusión de análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de la diabetes y enfermedades relacionadas con diabetes.

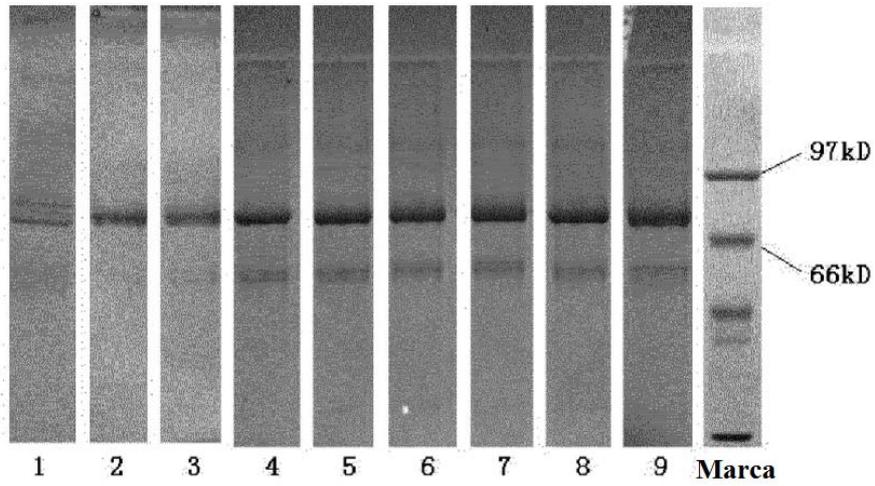


Fig. 1

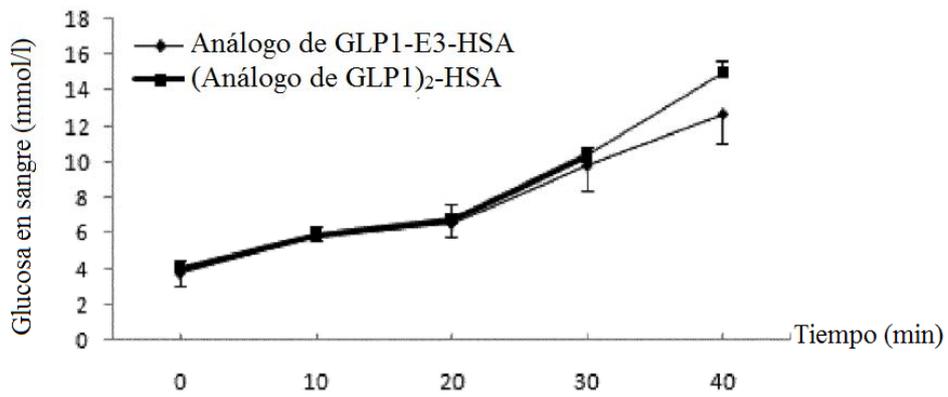


Fig. 2A

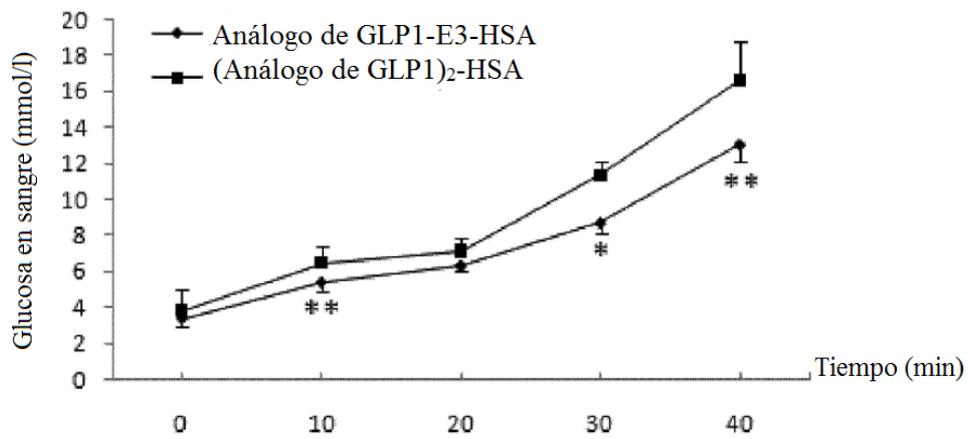


Fig. 2B

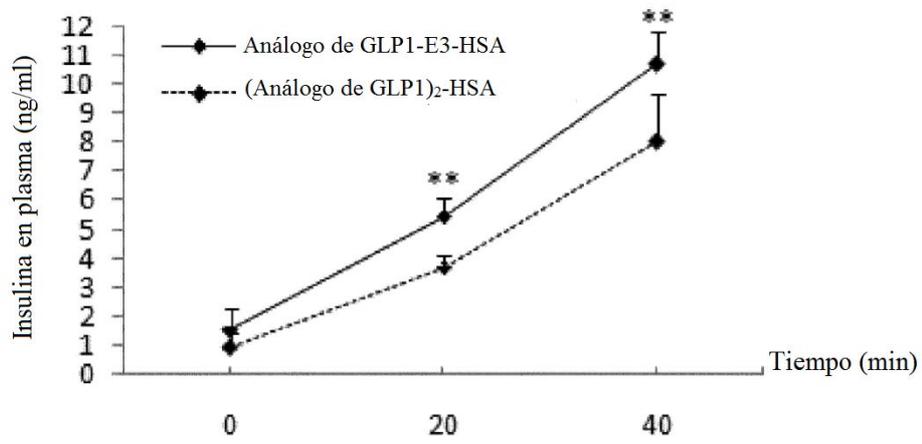


Fig. 2C

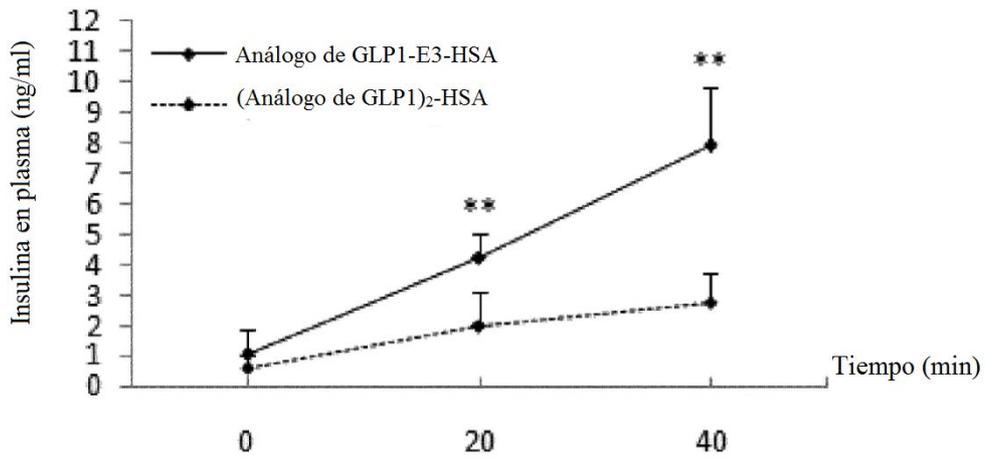


Fig. 2D

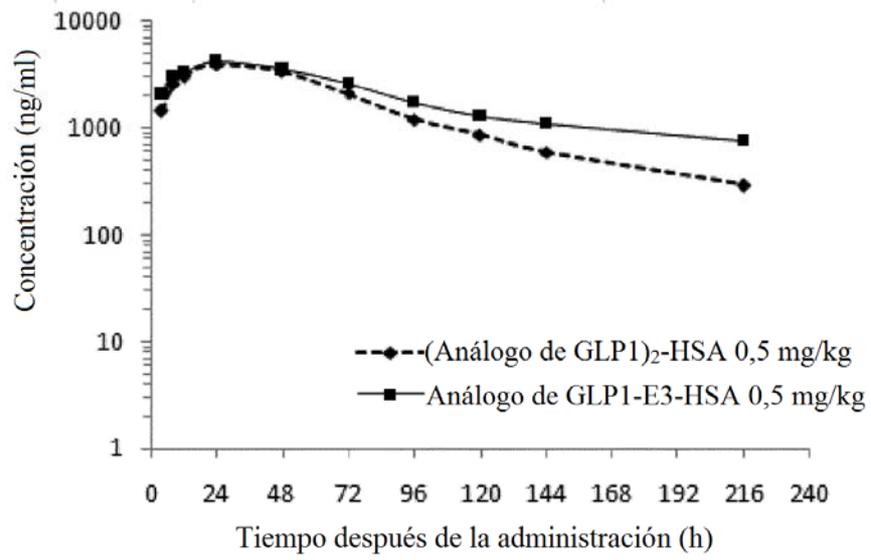


Fig. 3