

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 812**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00	(2006.01)
C07K 14/605	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
A61K 38/26	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01)
A61P 1/12	(2006.01)
A61P 3/08	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2015 PCT/KR2015/014542**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16108654**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2015 E 15875748 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3241850**

54 Título: **GLP y polipéptido fusionado a Fc híbrido de inmunoglobulina y su uso**

30 Prioridad:

31.12.2014 KR 20140195793

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

30.04.2020

73 Titular/es:

**GENEXINE, INC. (100.0%)
4th Fl., Bldg. B, Korea Bio Park Daewangpangyo-
ro 700 Bundang-gu
Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, KR**

72 Inventor/es:

**SUNG, YOUNG CHUL;
YANG, SE HWAN;
BYUN, MI SUN;
YANG, SANG IN y
SHIN, EUN JU**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 757 812 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

GLP y polipéptido fusionado a Fc híbrido de inmunoglobulina y su uso

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un polipéptido de fusión que contiene un péptido tipo glucagon (GLP) y un Fc híbrido de inmunoglobulina, y más específicamente, a un polipéptido de fusión con una vida media aumentada y una eficacia mejorada en comparación con el polipéptido de fusión convencional basado en el descubrimiento de un Fc híbrido de inmunoglobulina adecuada para GLP o análogos del mismo, y una composición farmacéutica para tratar diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por quimioterapia anticáncer o síndrome de intestino corto, que contiene el polipéptido de fusión. Además, un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión, un vector de expresión que contiene el polinucleótido y una célula huésped que contiene el vector de expresión también se incluyen en el alcance de la presente invención.

[Antecedentes de la técnica]

15 La diabetes es una enfermedad metabólica, que causa un problema en la secreción de insulina o la función de la insulina debido a razones genéticas o ambientales y, por lo tanto, la glucosa en la sangre no se puede utilizar como fuente de energía para las células, de este modo lo que muestra los síntomas de hiperglucemia con niveles altos de glucosa en sangre. La diabetes puede causar complicaciones y es una de las enfermedades crónicas más graves en la sociedad moderna.

20 La diabetes se puede clasificar en gran medida en diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. La diabetes tipo 1 representa menos de 10% de los pacientes diabéticos totales y ocurre principalmente en niños. Según se informa, la diabetes tipo 1 se produce cuando las células β pancreáticas no pueden producir o secretar insulina por su destrucción debido a enfermedades autoinmunes, etc., y por lo tanto, los pacientes con diabetes tipo 1 requieren inyecciones de insulina de por vida. En contraste, la diabetes tipo 2 representa 90% o más de pacientes diabéticos totales y ocurre principalmente en adultos, y en particular, con mayor frecuencia en adultos con sobrepeso y obesidad. Según se informa, la diabetes tipo 2 es causada por una secreción de insulina defectuosa o resistencia a la insulina en el páncreas.

25 Para el tratamiento de la diabetes, las personas generalmente comienzan con ejercicio físico y terapia de dieta. Sin embargo, cuando estos esfuerzos no logran controlar los niveles de glucemia, se puede administrar un agente diabético único o combinado. De acuerdo con las directrices de Asociación Americana de Diabetes (ADA), el fármaco de primera selección es metformina, los fármacos de segunda y tercera selección incluyen inhibidores de DPP-4 a base de sulfonilurea, a base de glinida, a base de tiazolidinodiona, etc., e inyecciones, tales como un agonista de péptido-1 tipo glucagon (GLP-1), o las inyecciones de insulina se siguen posteriormente.

30 Los agentes terapéuticos orales convencionales que se usan actualmente en el tratamiento clínico tienen la ventaja de ser capaces de mantener continuamente los niveles normales de glucosa en sangre, sin embargo, la administración a largo plazo de estos agentes no solo produce varios efectos adversos, tales como hipoglucemia, diarrea, aumento de peso corporal, problemas cardiovasculares, hepatotoxicidad, etc., sino que también causa la destrucción de las células β -pancreáticas, lo que finalmente requiere una inyección de insulina. Además, la inyección de insulina, como tratamiento final, se debe administrar por vía subcutánea dos o tres veces al día, lo que causa inconvenientes, y la inyección de insulina posiblemente puede inducir hipoglucemia, que es uno de los efectos adversos más graves.

35 Si bien se realizan esfuerzos para remediar estos problemas, GLP-1 ha estado en el centro de atención recientemente como el tratamiento para la diabetes de la próxima generación. GLP-1 y sus análogos y derivados han mostrado un buen potencial como agentes terapéuticos para tratar la diabetes tipo 2 en ensayos clínicos. Pueden inducir numerosos efectos biológicos, tales como estímulo de la secreción de insulina, inhibición de la secreción de glucagón, inhibición del vaciado gástrico, inhibición de la motilidad gástrica o intestinal, inducción de la reducción del peso corporal, etc. Además, pueden proteger el páncreas durante una administración a largo plazo, están libres de hipoglucemia y mantienen niveles adecuados de glucosa en sangre durante un período de tiempo prolongado.

40 Sin embargo, GLP-1 se degrada mediante DPP-4 *in vivo* y se vuelve inactivo, por lo que tiene una vida media muy corta *in vivo*, lo que dificulta su desarrollo como agente terapéutico. En consecuencia, se han llevado a cabo varios procedimientos de abordaje para prolongar la vida media de GLP-1 o reducir la tasa de eliminación de péptidos del cuerpo mientras se mantienen sus actividades biológicas. Es decir, se han desarrollado activamente varios análogos de GLP-1, y se ha intentado un procedimiento de abordaje para fusionar GLP-1 a una región Fc de inmunoglobulina (Patente U.S. Núm. 7,452,966 B2, etc.).

45 Sin embargo, la aplicación de la tecnología para fusionar la Fc de inmunoglobulina no ha progresado lo suficiente para su comercialización, desde el punto de vista de las limitaciones en la vida media, capacidad inductora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), estabilidad para la enzima DPP-4, etc.

Mientras tanto, se considera que la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) se produce debido a factores genéticos e

inmunológicos, sin embargo, es una enfermedad incurable en la que las causas y los tratamientos aún no se han dilucidado. Es una enfermedad crónica causada por la inflamación en la pared interna del tracto digestivo, y las enfermedades inflamatorias del intestino se clasifican en gran medida en colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

5 La colitis ulcerativa (UC) es una enfermedad inflamatoria crónica que se produce en la membrana mucosa del intestino grueso del tracto digestivo, y la inflamación comienza desde el recto y está continuamente conectada al intestino grueso. Los pacientes con colitis ulcerativa comúnmente se quejan de diarrea, heces con sangre, dolor abdominal, etc., y a menudo también se acompaña de síntomas tales como anorexia, pérdida de peso, fatiga, etc. En la mayoría de los casos, la colitis ulcerativa es una enfermedad intermitente que presenta repetidamente los períodos de síntomas exacerbados y los de síntomas mejorados, y a veces también hay períodos largos sin síntomas.

10 En la enfermedad de Crohn (CD), a diferencia de la colitis ulcerativa, la inflamación invade las capas completas del intestino y la distribución de las lesiones no es continua, sino que en muchos casos se encuentra dispersa. Los 5 síntomas frecuentes de la enfermedad de Crohn incluyen diarrea, dolor abdominal, anorexia, etc., pero las clases y grados de los síntomas varían mucho de acuerdo con los pacientes. En efecto, los pacientes con enfermedad de Crohn parecen experimentar un dolor más intenso en comparación con aquellos con colitis ulcerativa, y el progreso a largo plazo y las respuestas a los tratamientos de los pacientes con enfermedad de Crohn son mucho peores, por lo que a menudo se someten a cirugía.

15 Aunque todavía no se conoce el tratamiento efectivo que lleve a una cura completa de la enfermedad inflamatoria intestinal porque todavía no se han identificado las causas de la enfermedad inflamatoria intestinal, los estudios sobre los factores que afectan el progreso de la enfermedad inflamatoria intestinal han avanzado considerablemente, y se han desarrollado varios fármacos para reducir la inflamación y actualmente están en uso. Los agentes terapéuticos para la enfermedad inflamatoria intestinal ampliamente utilizados en la actualidad se aplican secuencialmente en el orden de los agentes antiinflamatorios (ácido 5-aminosalicílico; 5-ASA), agentes esteroideos, agentes inmunosupresores tales como 6-mercaptopirina (6-MP) y agentes biológicos tales como los inhibidores de TNF α (anticuerpo anti-TNF α , Infliximab), de acuerdo con la gravedad de los síntomas. Sin embargo, estos agentes actualmente en uso han mostrado varios efectos adversos y, en consecuencia, existe una necesidad urgente de desarrollar 1) un agente biológico que tenga la eficacia para compensar o reemplazar el de los fármacos existentes, o 2) un agente biológico que emplee un mecanismo diferente al de los fármacos existentes.

20 En un esfuerzo por compensar estos problemas, GLP-2 ha estado en el centro de atención recientemente como agente terapéutico para la enfermedad inflamatoria intestinal, GLP-2, que es secretado por las células L en el intestino, induce la producción de IGF-1, óxido nítrico (NO), péptido intestinal vasoactivo (VIP), etc., a través de la señalización de los receptores de GLP-2 expresados en el células intestinales. El IGF-1 así producido induce el crecimiento de las células intestinales a través de la señalización de PI-3K y AKT, y el NO ayuda a mejorar la circulación sanguínea en el intestino. Además, debido a que es sabido que el GLP-2 tiene el efecto antiinflamatorio al inducir la producción de VIP, también se ha confirmado experimentalmente en varios grupos de investigación que GLP-2 es eficaz para el tratamiento del síndrome del intestino corto, así como para la enfermedad inflamatoria intestinal.

30 En efecto, Gattex® (teduglutida), un análogo de GLP-2, fue desarrollado por NPS Pharmaceuticals, Inc. (USA) a fines de 2012, aprobado como un fármaco huérfano para el tratamiento del síndrome del intestino corto (SBS), y después de expandir las indicaciones, actualmente se encuentra en estudios clínicos de fase 2 entre pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

35 Sin embargo, aunque Gattex® tiene una vida media significativamente aumentada en comparación con el GLP-2 nativo, también se debe inyectar una vez al día, por lo que aún no cumple las necesidades no satisfechas desde el punto de vista de la conveniencia del paciente. Además, cuando el fármaco se debe aplicar a la enfermedad inflamatoria intestinal, que es una enfermedad autoinmune que requiere tratamiento de por vida, se debe desarrollar en forma de un agente terapéutico de acción prolongada que se puede administrar al menos una vez por semana a una vez mes. Es decir, debido a que GLP-2 es una hormona peptídica, tiene una duración significativamente menor en comparación con la de los fármacos proteicos y, por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento para mejorar la duración a largo plazo de GLP-2.

40 Por otro lado, dado que las células cancerosas se caracterizan por tener un rápido crecimiento y división, la mayoría de los agentes anticancerígenos están diseñados para matar células que crecen rápidamente. Sin embargo, algunas células normales también crecen rápidamente como las células cancerosas y, por lo tanto, estas células normales también son dañadas por la quimioterapia anticáncer. Las células que crecen y se dividen rápidamente entre las células normales, es decir, células sanguíneas formadas en la médula ósea, células epiteliales en el tracto gastrointestinal que contiene la cavidad oral, células pilosas y células germinales, que producen espermatozoides y óvulos, son afectadas más gravemente. En particular, los agentes anticáncer con frecuencia causan mucositis en el tracto gastrointestinal que puede causar diarrea, y en el caso de diarrea grave, se deben suministrar solución de Ringer y nutrientes mediante inyección intravenosa para prevenir la deshidratación. En tal caso, se puede tener que modificar el esquema de quimioterapia anticáncer preestablecido, de este modo se afecta considerablemente el tratamiento del cáncer. Por consiguiente, se considera esencial prevenir de antemano la endoenteritis o la diarrea causada por la quimioterapia

5 anticáncer, ya que puede reducir el dolor de los pacientes y maximizar el efecto anticáncer. En el caso de GLP-2, puede inducir la proliferación de células de la cripta, que forman las vellosidades del intestino delgado, por lo tanto capaces de recuperarse rápidamente de los efectos adversos debidos a la quimioterapia anticáncer y el desarrollo de un análogo de GLP-2 con una duración a largo plazo puede prevenir de antemano la endoenteritis o la diarrea causada por la quimioterapia anticáncer, mediante una inyección para cada ciclo.

10 En estas circunstancias, los presentes inventores, para desarrollar un agente terapéutico de acción prolongada mediante el aumento de la vida media *in vivo* de péptidos de corta longitud que contienen GLP, tales como GLP-1 y GLP-2, emplearon la tecnología de Fc híbrido de inmunoglobulina divulgada en la publicación internacional Núm. WO 2008-147143, que fue presentada previamente por los presentes inventores, seleccionó la Fc de inmunoglobulina optimizada para ser específica para el péptido tipo glucagon (GLP), y preparó un polipéptido de fusión con excelente resistencia a la enzima DPP-4 al mismo tiempo que tiene una vida media aumentada, de este modo se completa la presente invención.

[Divulgación]

[Problema técnico]

15 Un objeto de la presente invención es proporcionar un polipéptido de fusión que incluye (a) péptido tipo glucagon (GLP) o un análogo del mismo; y (b) un polipéptido de Fc de inmunoglobulina que contiene un número limitado de región de bisagra de IgD.

20 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para tratar diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por la quimioterapia anticáncer, o síndrome del intestino corto, que contiene el polipéptido de fusión como un ingrediente activo.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión, un vector de expresión que incluye el polinucleótido, y una célula huésped que incluye el vector de expresión.

[Solución técnica]

25 A fin de obtener los objetos anteriores, en un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión que incluye

(a) GLP o un análogo del mismo; y (b) un polipéptido de Fc de inmunoglobulina que contiene un número limitado de regiones de bisagra de IgD.

30 Específicamente, el polipéptido de fusión puede incluir (a) péptido tipo glucagon (GLP) o un análogo del mismo, y (b) un polipéptido de Fc de inmunoglobulina, en que el polipéptido de Fc de inmunoglobulina incluye (i) una región de bisagra de IgD aislada que consiste en una secuencia de aminoácidos de 35 a 49 residuos de aminoácidos consecutivos desde el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 25; y (ii) un dominio CH2 y un dominio CH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

35 Preferentemente, el extremo C-terminal del GLP o un análogo del mismo se puede conjugar con el extremo N-terminal del polipéptido de Fc de inmunoglobulina, y dentro del polipéptido de Fc de inmunoglobulina, el extremo C-terminal de la región de bisagra de IgD se puede conjugar con el extremo N-terminal del dominio CH2 y el dominio CH3. Por consiguiente, el GLP o un análogo del mismo; la región de bisagra de IgD; y el dominio CH2 y el dominio CH3 se puede conjugar secuencialmente desde el extremo N-terminal a la dirección del extremo C-terminal. Como se usa en la presente, el término "polipéptido de fusión" se refiere a la forma en que una molécula biológicamente activa, tal como GLP, y el polipéptido de Fc de inmunoglobulina se fusionan entre sí, y se pueden usar indistintamente con los términos tales como "polipéptido de fusión de Fc" y "proteína de fusión".

40 En la presente invención, el péptido tipo glucagon (GLP) es un concepto que abarca tanto GLP-1 como GLP-2.

45 Aunque los péptidos GLP-1 y GLP-2 difieren entre sí en términos de mecanismos y funciones de acción *in vivo*, son péptidos producidos a partir de un precursor de ARNm único del gen de proglucagon, tienen una alta homología de secuencia de aminoácidos, tienen el mismo sitio de escisión para la enzima DPP-4, y son hormonas que tienen características moleculares similares. Por lo tanto, cuando el péptido tipo glucagón (GLP) que contiene GLP-1 o GLP-2 se conjuga con el polipéptido de Fc de inmunoglobulina, se puede aplicar una forma similar. Específicamente, cuando el GLP se conjuga con el polipéptido de Fc híbrido (hyFc) desarrollado por los presentes inventores, se puede aplicar una forma similar de hyFc al mismo.

50 Como se usa en la presente, el término "GLP-1" ("péptido tipo glucagon 1" es un tipo de incretinas, que son hormonas secretadas en el tracto digestivo. En efecto, el GLP-1 es una proteína secretada a partir de células L intestinales de una manera dependiente de la dieta conocido para desempeñar el papel de aumento de la secreción de insulina pancreática y el papel de inhibir el aumento de los niveles de glucosa en sangre después de una comida por la inhibición de la secreción de glucagon. Como tal, el uso terapéutico de GLP-1 para el tratamiento de la diabetes ya se conoce

ampliamente, y también hay un informe de que GLP-1 está involucrado en el control fisiológico del apetito, de este modo tiene un efecto de reducción del peso corporal.

5 Por otro lado, el GLP-1 nativo se procesa *in vivo* para que los seis aminoácidos iniciales se puedan escindir de la molécula. De acuerdo con la práctica habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención, el extremo N-terminal de GLP-1 se designa como Núm. 7 mientras que el extremo terminal de GLP-1 se designa como Núm. 37. De acuerdo con el proceso, el GLP-1 se puede procesar a partir de GLP-1 (1-37), una forma sin la función de secreción de insulina, en una forma del GLP-1 (7-37) (la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 33) para ser una forma activa, y se puede modificar adicionalmente *in vivo* para que el residuo de glicina en el extremo C-terminal se pueda eliminar y reemplazar con un grupo amida, de este modo se
10 convierte en el GLP-1 (7-36) amida (la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 35). En consecuencia, GLP-1 (7-37) OH y GLP-1 (7-36) amida corresponden a dos tipos nativos de GLP-1.

15 Sin embargo, el GLP-1 nativo tiene muchas limitaciones para desarrollarse como fármaco porque, por ejemplo, se escinde rápidamente *in vivo* mediante la enzima DPP-4 y se vuelve inactivo, por lo que ha habido muchos intentos de aumentar su vida media *in vivo*. A este respecto, se han hecho intentos para preparar análogos de GLP-1, lo que produce una modificación en GLP-1, de este modo se reduce la escisión por la enzima DPP-4, y para este fin, los análogos de GLP-1 conocidos en la técnica se pueden usar sin limitación.

20 Específicamente, la sustitución del aminoácido en la posición 8 puede reducir la velocidad con la que la enzima DPP-4 inactiva GLP-1; la sustitución del aminoácido en la posición 22 puede reducir la posibilidad de adhesión de las moléculas y aumentar la eficacia de las moléculas; y la sustitución del aminoácido en la posición 36 puede reducir el riesgo de que una proteína de fusión pueda inducir una respuesta inmune neutralizante después de una administración repetida y continua. Por consiguiente, se pueden usar análogos de GLP-1 que tienen una sustitución de aminoácidos en la posición 8, 22 o 36, respectivamente, aunque no se limitan a los mismos. Además, como se describe en la patente U.S. 7,452,966 B2, etc., se pueden usar análogos que tienen una sustitución de aminoácidos en la posición 33, 34 o 37,
25 respectivamente.

En una realización más específica, los análogos de GLP-1 pueden ser preferentemente lo que tienen una modificación en la región escindida por la enzima DPP-4. La enzima DPP-4 escinde el GLP-1 entre los aminoácidos en las posiciones 8 y 9, y en consecuencia, los análogos de GLP-1 en los que alanina (A), el aminoácido en la posición 8, está sustituido con glicina (G) o valina (V), puede reducir la escisión mediante la enzima DPP-4.

30 Adicionalmente, los análogos de GLP-1 pueden ser aquellos en los que la glicina (G), el aminoácido en la posición 22, está sustituido con ácido glutámico (E); o arginina (R), el aminoácido en la posición 36, está sustituido con glicina (G).

35 Por consiguiente, preferentemente, los análogos de GLP-1 pueden ser los que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12, en que los aminoácidos en la posición 8, 22, y/o 36 del GLP-1 (7-37) está sustituidos; o pueden ser los que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24, en la que los aminoácidos en la posición 8, 22, y/o 36 de GLP-1 (7-36) están sustituidos. Adicionalmente, más preferentemente, los análogos de GLP-1 pueden ser los que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 23, o 24, en la que está modificado el aminoácido en la posición 8, el sitio de escisión mediante la enzima DPP-4, y con máxima preferencia, un análogo de GLP-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en la que la alanina (A), el aminoácido en la posición 8, está sustituido con glicina (G).
40 El análogo de GLP-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 se puede codificar mediante la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 34. En una realización ejemplar de la presente invención, la eficacia se confirmó usando el análogo de GLP-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Las posiciones de las modificaciones en los análogos de GLP-1 se resumen en la siguiente Tabla 1.

[Tabla 1]

GLP-1 (7-37)		GLP-1 (7-36)	
SEQ ID NO	Posición de la modificación	SEQ ID NO	Posición de la modificación
2	A8G	14	A8G
3	A8V	15	A8V
4	G22E	16	G22E
5	R36G	17	R36G
6	A8G G22E	18	A8G G22E
7	A8V G22E	19	A8V G22E
8	A8G R36G	20	A8G R36G
9	A8V R36G	21	A8VR36G
10	G22E R36G	22	G22E R36G
11	A8G 22E R36G	23	A8G 22E R36G
12	A8V 22E R36G	24	A8V 22E R36G

5 Como se usa en la presente, el término "péptido tipo glucagon-2 (GLP-2)" se refiere a una hormona peptídica que tiene 33 aminoácidos cortos (de la SEQ ID No: 44), que se genera a través de la escisión enzimática mediante una enzima intestinal después de ser producida en las células L endocrinas intestinales, las células secretoras en el intestino y los dominios del cerebro particulares en forma de precursor del glucagón. GLP-2 reacciona a la ingestión de nutrientes junto con la ingesta de alimentos y se cosecreta con GLP-1, oxintomodulina y glicentina.

10 Es ampliamente conocido que GLP-2 es efectivo no solo para la enfermedad inflamatoria intestinal sino también para el síndrome del intestino corto (SBS), etc. En efecto, Gattex® (teduglutida), un análogo de GLP-2 desarrollado por NPS Pharmaceuticals, Inc. (USA) a fines de 2012, aprobado como fármaco huérfano para el tratamiento del síndrome del intestino corto (SBS), y después de expandir las indicaciones, se encuentra actualmente en estudios clínicos de fase 2 entre pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

15 GLP-2 se secreta como un péptido de 33 aminoácidos y se puede escindir mediante la enzima DPP-4, como es el caso con GLP-1. Específicamente, debido a que GLP-2 se escinde rápidamente mediante la enzima DPP-4 en el aminoácido en la posición 2, es decir, alanina (A), y por lo tanto genera un GLP-2 humano inactivo, tenía una limitación para desarrollarse como fármaco debido a la vida media corta *in vivo*. En consecuencia, también ha habido un intento de preparar análogos de GLP-2 mediante la realización de una modificación en GLP-2, de este modo se reduce la escisión por la enzima DPP-4, y para este fin, los análogos de GLP-2 conocidos en la técnica se pueden usar sin limitación.

20 Específicamente, la sustitución del aminoácido en la posición 2 puede reducir la velocidad con la que la enzima DPP-4 inactiva el GLP-2. Es decir, los análogos de GLP-2, que tienen una sustitución de aminoácidos en la posición 2 de alanina (A) a glicina (G), serina (S) o valina (V), pueden reducir la escisión mediante la enzima DPP-4. Además, en otra realización, se puede usar el análogo de GLP-2 descrito en la Publicación de la solicitud de patente U.S. Núm. 2007/0117752 A1. Específicamente, las sustituciones pueden incluir la sustitución de aminoácidos en la posición 2; sustituciones de aminoácidos adicionales en las posiciones 3, 5, 7, 10 y 11, y/o supresión de aminoácidos en las posiciones del 31 a 33, y/o adición de una secuencia de péptido estabilizante en el extremo N-terminal o C-terminal, junto con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 8, 16, 24 y 28. Más específicamente, la alanina (A), el aminoácido en la posición 2, puede sustituirse con glicina (G), serina (S), o valina (V); ácido aspártico (D), el aminoácido en la posición 3, con ácido glutámico (E); serina (S), el aminoácido en la posición 5, con treonina (T); fenilalanina (F), el aminoácido en la posición 6, con prolina (P); serina (S), el aminoácido en la posición 7, con treonina (T); ácido aspártico (D), el aminoácido en la posición 8, con serina (S); ácido glutámico (E), el aminoácido en la posición 9, con ácido aspártico (D); metionina (M), el aminoácido en la posición 10, con leucina (L), norleucina (Nle), o un aminoácido sustituido con Met estable a la oxidación; asparagina (N), el aminoácido en la posición 11, con alanina (A), lisina (K), o serina (S); treonina (T), el aminoácido en la posición 12, con lisina (K); isoleucina (I), el aminoácido en la posición 13,

5 con ácido glutámico (E) o glutamina (Q); leucina (L), el aminoácido en la posición 14, con metionina (M) o norleucina (Nle); ácido aspártico (D), el aminoácido en la posición 15, con ácido glutámico (E); asparagina (N), el aminoácido en la posición 16, con alanina (A); leucina (L), el aminoácido en la posición 17, con ácido glutámico (E); alanina (A), el aminoácido en la posición 19, con treonina (T); arginina (R), el aminoácido en la posición 20, con lisina (K); ácido aspártico (D), el aminoácido en la posición 21, con isoleucina (I); asparagina (N), el aminoácido en la posición 24, con alanina (A) o ácido glutámico (E); glutamina (Q), el aminoácido en la posición 28, con alanina (A) o asparagina (N); isoleucina (I), el aminoácido en la posición 31, con prolina (P) o suprimir; treonina (T), el aminoácido en la posición 32, se puede suprimir; y el ácido aspártico (D), el aminoácido en la posición 33, se puede sustituir con asparagina (N) o suprimir.

10 Varias modificaciones descritas anteriormente se pueden aplicar a GLP-2, sin limitadas a estas, y de máxima preferencia, el GLP-2 puede ser un análogo de GLP-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45, en la que la alanina (A), el aminoácido en la posición 2, está sustituida con glicina (G); o un análogo de GLP-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, en la que la alanina (A), el aminoácido en la posición 2, está sustituida con valina (V). El análogo de GLP-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 se puede codificar mediante la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 51.

15 Se reconoce que los GLP (GLP-1 o GLP-2) o sus análogos no se pueden usar apropiadamente como fármacos terapéuticos porque son rápidamente escindidos por la enzima DPP-4 y se vuelven inactivos *in vivo*, los presentes inventores, en un intento por resolver el problema, han desarrollado un polipéptido de Fc de inmunoglobulina adecuado para GLP-1 o GLP-2 y posteriormente prepararon un polipéptido de fusión mediante su fusión. Específicamente, han intentado aumentar significativamente la vida media *in vivo* de un GLP-1 o GLP-2, de este modo permiten que un GLP-1 o GLP-2 exhiba continuamente la eficacia del fármaco *in vivo*. Además, han desarrollado polipéptidos de fusión que tienen excelencia en los aspectos de estabilidad del suero, resistencia a DPP-4, perfiles farmacodinámicos, etc.

20 Para este propósito, la presente invención tiene como objetivo preparar un polipéptido de fusión mediante la fusión de hyFc5 (hFc-5), preparado en la Publicación internacional Núm. WO 2008/147143 de acuerdo con la tecnología de Fc híbrido de inmunoglobulina, al GLP-1 o GLP-2. Como se usa en la presente, el término "híbrido" se refiere a las secuencias que codifican dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina de diferentes orígenes que están presentes en una región Fc de inmunoglobulina de cadena simple. El hyFc5, que es un hyFc que incluye una región bisagra de IgD con una longitud de 30 aminoácidos, mostró un aumento significativo en la vida media cuando se aplica a proteínas grandes, pero el efecto se redujo mucho cuando se aplica a péptidos relativamente cortos, por ejemplo, para el GLP-1 o GLP-2 de la presente invención, y a este respecto, se preparó el polipéptido de fusión con efecto mejorado de la presente invención.

25 Como se usa en la presente, el término "fragmento Fc de inmunoglobulina" o "Fc de inmunoglobulina" se refiere a una proteína, que incluye una región constante de cadena pesada (CH) pero no las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de una inmunoglobulina y la región constante de cadena liviana (CL). El Fc puede incluir además una región de bisagra, y para el propósito de la presente invención, puede incluir la región constante de cadena pesada 2 (CH2) y la región constante de cadena pesada 3 (CH3), pero puede incluir o no la región constante de cadena pesada (CH1).

30 El fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede incluir la región bisagra, la región del dominio CH2 y la región del dominio CH3, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. Específicamente, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser un fragmento Fc de inmunoglobulina híbrido. En consecuencia, la región bisagra puede incluir la región bisagra de Ig humana, la región del dominio CH2 puede incluir los residuos de aminoácidos de los dominios CH2 de IgD e IgG4 humana y el dominio CH3 puede incluir los residuos de aminoácidos del dominio CH de IgG4 humana.

35 El polipéptido de inmunoglobulina Fc, que es adecuado para el GLP o análogos del mismo de la presente invención, se caracterizan por incluir una región bisagra de IgD con una longitud de 35 a 49 aminoácidos. La región de la bisagra básicamente sirve para mantener la flexibilidad cuando se une a una molécula biológica activa como GLP-1 o GLP-2, de este modo se mantiene la estructura. Específicamente, la región bisagra puede ser una región bisagra de IgD aislada que tiene una secuencia de aminoácidos de 49 aminoácidos consecutivos desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 25 (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 36), en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 de la región de bisagra de IgD. Adicionalmente, preferentemente, la región bisagra puede ser una región de bisagra de IgD que tiene una secuencia de aminoácidos de 35 a 40 aminoácidos consecutivos desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 25, más preferentemente, una región de bisagra de IgD que tiene una secuencia de aminoácidos de 35 a 40 aminoácidos consecutivos, y aun más preferentemente, una secuencia de aminoácidos de 40 aminoácidos consecutivos. En la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, la región de bisagra de IgD que consiste en una secuencia de aminoácidos de 35 aminoácidos consecutivos se indicó como la SEQ ID NO: 26, la región de bisagra de IgD que consiste en una secuencia de aminoácidos de 40 aminoácidos consecutivos como la SEQ ID NO: 27, la región de bisagra de IgD que consiste en una secuencia de aminoácidos de 49 aminoácidos consecutivos como la SEQ ID NO: 28, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 como la SEQ ID NO: 37, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 como la SEQ ID NO: 38, y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 como la SEQ ID NO: 39, respectivamente.

Los dominios de CH2 y CH3 del Fc de inmunoglobulina que están conjugados con la región de bisagra de IgD se pueden usar sin limitación siempre que no alteren la eficacia farmacocinética y farmacológica del polipéptido de fusión de la presente invención, o no produzcan citotoxicidad tal como ADCC y/o CDC, y preferentemente, los dominios de CH2 y CH3 del Fc híbrido de la presente invención. En forma específica, se pueden usar los dominios de CH2 y CH3 que consisten en la secuencia de aminoácidos codificados por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 40.

El GLP o sus análogos y un polipéptido de Fc de inmunoglobulina que incluye la región de bisagra de IgD y los dominios de CH2 y CH3 se conjugan y de este modo se puede constituir el polipéptido de fusión de la presente invención.

Por ejemplo, cuando se incluye el GLP-1 en el polipéptido de fusión de la presente invención, el polipéptido de fusión puede ser uno que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 30 a 32, y en forma más específica, uno que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 o 31, o uno que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, aunque sin limitación. La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 está en una forma en que el análogo de GLP-1 de la SEQ ID NO: 2 de la presente invención, la región de bisagra de IgD de la SEQ ID NO: 26, y los dominios de CH2 y CH3 de la SEQ ID NO: 29 se conjugan entre sí, y se indica como "GLP-1-hyFc8". La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 está en una forma en que el análogo de GLP-1 de la SEQ ID NO: 2 de la presente invención, la región de bisagra de IgD de la SEQ ID NO: 27, y los dominios de CH2 y CH3 de la SEQ ID NO: 29 se conjugan entre sí, y se indica como "GLP-1-hyFc9". La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 está en una forma en que el análogo de GLP-1 de la SEQ ID NO: 2 de la presente invención, la región de bisagra de IgD de la SEQ ID NO: 28, y los dominios de CH2 y CH3 de la SEQ ID NO: 29 se conjugan entre sí, y se indica como "GLP-1-hyFc11".

Adicionalmente, en otra realización ejemplar de la presente invención, cuando se incluye GLP-2 en el polipéptido de fusión de la presente invención, el polipéptido de fusión puede ser uno que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 47 a 49, y en forma más específica, uno que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 48 o 49, o uno que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49, aunque sin limitación. La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 está en una forma en que el análogo de GLP-2 de la SEQ ID NO: 45 de la presente invención, la región de bisagra de IgD de la SEQ ID NO: 26, y los dominios de CH2 y CH3 de la SEQ ID NO: 29 se conjugan entre sí, y se indica como "GLP-2-hyFc8". La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 está en una forma en que el análogo de GLP-2 de la SEQ ID NO: 45 de la presente invención, la región de bisagra de IgD de la SEQ ID NO: 27, y los dominios de CH2 y CH3 de la SEQ ID NO: 29 se conjugan entre sí, y se indica como "GLP-2-hyFc9". La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 está en una forma en que el análogo de GLP-2 de la SEQ ID NO: 45 de la presente invención, la región de bisagra de IgD de la SEQ ID NO: 28, y los dominios de CH2 y CH3 de la SEQ ID NO: 29 se conjugan entre sí, y se indica como "GLP-2-hyFc11".

En una realización ejemplar de la presente invención, GLP-1-hyFc5 se preparó primero mediante la conjugación del hyFc5, que incluye la región de bisagra de IgD que consiste en una secuencia de 30 aminoácidos desarrollada previamente por los presentes inventores, a un GLP-1 (FIG. 1). Se demostró que la vida media de GLP-1-hyFc5 aumentó en comparación con la del péptido convencional con GLP-1 solo. Sin embargo, se confirmó que el efecto del aumento de la vida media mostrado cuando se aplicó el hyFc5 a un GLP-1, que es un péptido corto, no fue tan alto como los efectos exhibidos cuando se aplicó el hyFc5 a una proteína grande.

Por consiguiente, los presentes inventores, mientras se esfuerzan por encontrar un polipéptido de Fc de inmunoglobulina que muestre una eficacia mejorada en comparación con la del hyFc5 cuando se aplica a un GLP-1, han descubierto que, en el caso de un péptido corto tal como un GLP-1 o un GLP-2, el aumento de la longitud de la región de bisagra permite la preparación de un polipéptido de fusión que tiene una actividad excelente junto con una vida media excelente. Es decir, hay un sitio de escisión sensible a la proteasa vulnerable a la degradación de la proteasa en la región bisagra de IgD, y cuando el tamaño de la proteína fisiológica para conjugarse con el polipéptido de Fc de inmunoglobulina era grande, el sitio de escisión no estaba expuesto, por lo que no causó problemas. Sin embargo, en el caso de un péptido corto tal como el GLP-1 o GLP-2, el sitio de escisión estaba expuesto y, por lo tanto, no hubo un aumento suficiente en la vida media como se esperaba. Sin embargo, se confirmó que el aumento en la longitud de la región de la bisagra podría resolver el problema.

Como tal, en una realización ejemplar de la presente invención, se preparó hyFc9, que incluye una región bisagra de IgD que consiste en una secuencia de 40 aminoácidos (FIG. 2). A partir de esto, se prepararon el hyFc8 que incluye una región bisagra de IgD que consiste en una secuencia de 35 aminoácidos y el hyFc11 que incluye una región bisagra de IgD que consiste en una secuencia de 49 aminoácidos, y finalmente, se prepararon los polipéptidos de fusión GLP-1-hyFc8-, y GLP-1-hyFc11. Además, como resultado de la medición de los perfiles PK de los polipéptidos de fusión preparados de este modo de la presente invención, se demostró que estos polipéptidos de fusión tienen vidas medias significativamente mejoradas en comparación con el péptido con GLP-1 solo, e incluso en comparación con la de GLP-1-hyFc5 (FIG. 5 y 6), y por lo tanto se esperaba que mostraran una eficacia farmacológica más efectiva.

Además, cuando GLP-1-hyFc9, como el polipéptido de fusión representativo entre los polipéptidos de fusión, se comparó en varios efectos con el GLP-1-hyFc5 convencional, se demostró que GLP-1-hyFc9 era excelente en todos los aspectos, que incluye estabilidad del suero (FIG. 7), resistencia de DPP-4 (FIG 8) y perfil PD (FIG 9). Además, también se demostró que GLP-1-hyFc9 es excelente con respecto al efecto de reducir el peso corporal (FIG 10).

5 Además, en una realización ejemplar de la presente invención, cuando se comparó GLP-1-hyFc9 con respecto al efecto de la inhibición de ADCC en comparación con el de GLP-1-ligador-IgG4-mut (Patente U.S. N.º 7,452,966 B2), se confirmó que GLP-1-hyFc9 tiene un mayor efecto de inhibición de ADCC que GLP-1-ligador-IgG4-mut (FIG 11). En efecto, aunque GLP-1-ligador-IgG4-mut fue aquel en el que se aplicaron modificaciones a algunos aminoácidos de un Fc de inmunoglobulina con el fin de prevenir ADCC, se demostró que GLP-1-hyFc9 de la presente invención tiene una actividad inhibitoria mucho mayor contra ADCC.

10 Adicionalmente, en una realización ejemplar de la presente invención, los polipéptidos de fusión se prepararon para GLP-2, de la misma manera que en GLP-1. En forma específica, se preparó GLP-2-hyFc9 que incluye una región de bisagra de IgD que consiste en una secuencia de 40 aminoácidos (FIG. 3), y sobre la base de esto, se prepararon el GLP-2-hyFc8 que incluye una región de bisagra de IgD que consiste en una secuencia de 35 aminoácidos y el GLP-2-hyFc11 que incluye una región de bisagra de IgD que consiste en una secuencia de 49 aminoácidos. Se demostró que GLP-2-hyFc9 entre los polipéptidos de fusión preparados de este modo tiene una vida media aumentada en comparación con la de GLP-2-hyFc5 (Ejemplos 2 a 4).

15 Adicionalmente, en otra realización ejemplar de la presente invención, se examinaron las diversas actividades biológicas de GLP-2-hyFc9 y, como resultado, se confirmó que GLP-2-hyFc9 no reduce la actividad de AMPc, que puede reducir la inflamación (FIG. 12), y se demostró que tiene excelentes efectos en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (FIG. 13), induce la proliferación de células epiteliales intestinales (FIG. 14), promueve el crecimiento del intestino delgado (FIG. 15), reduce la diarrea y la letalidad (FIGS. 16 y 17), etc. En particular, se demostró que GLP-2-hyFc9 mantiene un efecto excelente incluso con una cantidad menor en comparación con la del grupo de comparación.

20 En conclusión, a partir de los resultados anteriores, es evidente que los polipéptidos de fusión de la presente invención han aumentado la vida media en comparación con los GLP-1 o GLP-2 convencionales, y en particular, los polipéptidos de fusión que incluyen el GLP-1 tienen excelente efecto hipoglucémico, efecto reductor del peso corporal y resistencia a la enzima DPP-4 y, por lo tanto, se pueden usar de manera efectiva para tratar la diabetes, mientras que los polipéptidos de fusión que incluyen el GLP-2 tienen un efecto intestinotrófico y, por lo tanto, se pueden usar efectivamente para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por quimioterapia anticáncer, o síndrome del intestino corto, etc.

25 Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar la diabetes que contiene el polipéptido de fusión como ingrediente activo, y una composición farmacéutica para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por quimioterapia anticáncer, o síndrome del intestino corto, etc, que contiene el polipéptido de fusión como ingrediente activo.

30 En particular, la diabetes puede ser diabetes tipo 2, y la enfermedad inflamatoria intestinal puede ser colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn.

Además, la endoenteritis o la diarrea pueden ser inducidas por la quimioterapia anticáncer, y en particular, la quimioterapia anticáncer puede incluir cualquier quimioterapia sin limitación, siempre que la quimioterapia pueda inducir endoenteritis o diarrea, por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), irinotecano, leucovorina, oxaliplatino, etc.

35 En una realización ejemplar, el polipéptido de fusión de la presente invención se puede usar efectivamente para tratar la diabetes al contener GLP-1 o análogos del mismo, que se han conocido como un agente terapéutico para tratar la diabetes. Además, debido a la vida media aumentada, excelente efecto hipoglucémico y resistencia aumentada a la enzima DPP-4, el polipéptido de fusión de la presente invención ha mejorado los perfiles del fármaco en comparación con los de fármacos convencionales y, por lo tanto, se puede aplicarse a fármacos.

40 Adicionalmente, en otra realización ejemplar, el polipéptido de fusión de la presente invención se puede usar efectivamente para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por la quimioterapia anticáncer o el síndrome del intestino corto al contener GLP-2 o análogos de los mismos, que se conocen como agentes terapéuticos para el tratamiento enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por quimioterapia anticáncer, o síndrome del intestino corto, y debido a la vida media aumentada, tienen excelentes perfiles farmacológicos en comparación con los fármacos convencionales, por lo tanto se puede aplicar a los fármacos.

45 El polipéptido de fusión de la presente invención se puede usar para tratar una amplia variedad de enfermedades y síntomas.

50 En una realización ejemplar, cuando el GLP incluido en el polipéptido de fusión de la presente invención es GLP-1, el polipéptido de fusión actúa en primer lugar en receptores llamados "receptores GLP-1" y por lo tanto exhibe efectos biológicos. Por consiguiente, los sujetos que tienen enfermedades y/o síntomas que responden fácilmente a la

estimulación de los receptores GLP-1 o la administración de compuestos GLP-1 se pueden tratar usando el polipéptido de fusión de la presente invención. Estos sujetos se denominan "requieren el tratamiento con compuestos GLP-1" o "necesitan la estimulación de los receptores GLP-1". Se incluyen los sujetos que tienen diabetes no insulino dependiente, diabetes insulino dependiente, apoplejía (ver el documento WO 00/16797), infarto de miocardio (ver el documento WO 98/08531), obesidad (ver el documento WO 98/19698), cambios después de la cirugía (ver la Patente U.S. Núm. 6,006,753), dispepsia funcional y síndrome del intestino irritable (ver el documento WO 99/64060). También se incluyen los sujetos (ver el documento WO 00/07617) que requieren tratamiento preventivo con compuestos GLP-1, por ejemplo, aquellos que tienen el riesgo de tener diabetes no insulino dependiente. Los sujetos que presentan resistencia a la glucosa dañada, glucosa rápida dañada, aquellos cuyo peso corporal representa aproximadamente el 25% o más en relación con el peso corporal normal con respecto a la altura y el tamaño de los sujetos, los que han recibido una pancreatometomía parcial, los que tienen al menos uno de los padres con diabetes no insulino dependiente, los que han tenido diabetes gestacional y los que han tenido pancreatitis aguda o crónica tienen el riesgo de desarrollar diabetes no insulino dependiente.

Adicionalmente, en otra realización ejemplar, cuando el GLP incluido en el polipéptido de fusión de la presente invención es GLP-2, el polipéptido de fusión se puede usar para tratar y prevenir trastornos gastrointestinales, por ejemplo, para el tratamiento de osteoporosis, síntomas mediados por DPP-4, recién nacidos con funciones intestinales dañadas, etc. Los ejemplos de trastornos gastrointestinales pueden incluir úlcera, gastritis, síndrome de dispepsia, síndrome de intestino corto, síndrome cul-de-sac, enfermedad inflamatoria intestinal, enteropatía inducida por gluten o celiaquía producida por dispepsia crónica, esprue tropical, enfermedad de hipogammaglobulinemia, gastroenteritis, gastroenteritis local (enfermedad de Crohn), colitis ulcerativa, síndrome del intestino irritable asociado a la diarrea, lesión del intestino delgado, síndrome del intestino corto, endoenteritis causada por quimioterapia anticáncer y diarrea causada por quimioterapia anticáncer. Además, se pueden incluir otros síntomas, tales como la gastroenteritis debido a la radiación, el gastroenteritis inflamatorio o gastroenteritis después de la inflamación y lesiones del intestino delgado por materiales tóxicos u otras quimioterapias.

La cantidad efectiva del polipéptido de fusión descrito en la presente invención es la cantidad que puede provocar los efectos deseado del tratamiento y/o prevención sin inducir efectos adversos inaceptables, cuando el polipéptido de fusión se administra a un sujeto que necesita la estimulación del receptor de GLP-1 o GLP-2. El "efecto deseado" incluye al menos uno que se describe a continuación: 1) reducción de enfermedad o síntoma asociado de la misma; 2) retraso en el inicio de los signos asociados con la enfermedad o síntoma; 3) un aumento de la expectativa de vida en comparación con ausencia de tratamiento; y 4) mayor calidad de vida en comparación con ausencia de tratamiento. Por ejemplo, la "cantidad efectiva" del polipéptido de fusión de la presente invención se refiere a la cantidad que puede causar un retraso en la aparición de complicaciones diabéticas, tales como retinopatía, neuropatía y enfermedad renal, al causar un mayor control de niveles de glucosa en sangre en comparación con los del caso no tratado. La "cantidad efectiva" del polipéptido de fusión de la presente invención para prevenir la diabetes se refiere a la cantidad que puede retrasar la aparición de una enfermedad en el aumento del nivel de glucosa en sangre que requiere el tratamiento con fármacos antihipoglucémicos, tales como sulfonilurea, tiazolidinodiona, insulina y/o bisguanidina, en comparación con la del caso no tratado.

En una realización ejemplar de la presente invención, se confirmó que el polipéptido de fusión de la presente invención también tiene una excelente eficacia farmacológica para tratar la diabetes, además del experimento que confirmó los perfiles de PK confirmados por la vida media. Específicamente, cuando se examinó el perfil farmacodinámico (PD) del polipéptido de fusión GLP-1-hyFc9 en un experimento *in vivo*, se demostró que el polipéptido de fusión GLP-1-hyFc9 tiene un efecto hipoglucémico mucho mayor en comparación con el de GLP-1-hyFc5 (FIG. 9), y también en un experimento *in vitro*, se demostró que el polipéptido de fusión GLP-1-hyFc9 tiene una resistencia significativamente mayor a la enzima DPP-4, lo que confirma que el polipéptido de fusión GLP-1-hyFc9 tiene un efecto excelente con respecto a la estabilidad de la enzima DPP-4 (FIG. 8). Por lo tanto, es evidente que el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre es importante en el tratamiento de la diabetes, y considerando que el inhibidor de DPP-4 se usa normalmente como un agente terapéutico para tratar la diabetes, el polipéptido de fusión de la presente invención se puede usar como un excelente fármaco para el tratamiento de la diabetes.

Como se usa en la presente, el término "tratamiento" se refiere a todas las acciones que restauran o cambian beneficiosamente los síntomas de diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por quimioterapia anticáncer, síndrome de intestino corto, mediante la administración del polipéptido de fusión de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica que contiene la misma.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener el polipéptido de fusión a un % en peso variado como ingrediente activo, siempre que pueda exhibir el efecto terapéutico para tratar diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por la quimioterapia anticáncer o síndrome del intestino corto.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener además portadores, excipientes o diluyentes apropiados de acuerdo con el procedimiento convencional. Los ejemplos de los portadores, excipientes y diluyentes contenidos en la composición de la presente invención puede incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa,

metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, etc., pero no se limita a los mismos.

5 La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar de acuerdo con el procedimiento convencional en un tipo de formulación para administración oral, tal como polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes y aerosoles; un tipo de formulación para uso externo; un tipo de formulación para supositorios; o un tipo de formulación para inyecciones estériles. Específicamente, las formulaciones se pueden preparar usando un diluyente o excipiente de uso común, tal como un relleno, un extensor, un aglutinante, un humectante, un desintegrante, un tensioactivo, etc. Las formulaciones sólidas para administración oral pueden incluir comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, etc., y estas formulaciones sólidas se pueden preparar mediante la adición de al menos un
10 excipiente, por ejemplo, almidón, carbonato de calcio, sacarosa o lactosa, gelatina, etc. Además, se puede usar un lubricante tal como estearato de magnesio y talco, además de un excipiente simple. Los ejemplos de formulaciones líquidas para administración oral pueden incluir suspensiones, fármacos líquidos para uso interno, emulsiones, jarabes, etc., y varias clases de excipientes como humectantes, edulcorantes, fragancias, conservantes, etc., además de los diluyentes simples de uso frecuente tal como agua y parafina líquida. Los ejemplos de formulaciones para
15 administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, formulaciones liofilizadas y supositorios. Para disolventes y suspensiones no acuosas, se puede usar propilenglicol, polietilenglicol, un aceite vegetal tal como aceite de oliva, un éster inyectable como el oleato de etilo. Los ejemplos de bases para supositorios pueden incluir Witepsol, macrogol, Tween 61, manteca de cacao, laurinum, glicerogelatina, etc.

20 La composición de la presente invención se administra en una cantidad farmacéuticamente efectiva. Como se usa en la presente, el término "cantidad farmacéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para el tratamiento de enfermedades con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a un tratamiento médico sin causar ningún efecto adverso, y el nivel de la dosis efectiva se puede determinar sobre la base de los factores que incluyen las condiciones de salud de un paciente, tipo de enfermedad, gravedad de la enfermedad, actividad del fármaco, sensibilidad del
25 fármaco, procedimiento de administración, tiempo de administración, vía de administración y tasa de excreción, duración del tratamiento, factores que incluyen el/los fármacos para mezclar o utilizar simultáneamente en combinación, y otros factores bien conocidos en el campo médico.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar sola o en combinación con otro agente terapéutico, que exhibe efectos terapéuticos para tratar diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por quimioterapia anticáncer o síndrome del intestino corto. La composición
30 farmacéutica de la presente invención se puede administrar en varias vías a mamíferos, que incluyen ratas, ratones, ganado, humanos, etc. La administración significa la introducción de un material particular a un paciente de una manera apropiada, y la composición se puede administrar mediante cualquiera de las vías comunes siempre que la composición pueda llegar a un tejido objetivo. Por ejemplo, la administración se puede realizar por vía intraarticular, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar, intrarrectal, etc., pero no se limita a estas.
35

El polipéptido de fusión de la presente invención se administra preferentemente una vez en cuatro semanas, una vez en dos semanas, o una vez por semana. El polipéptido de fusión se puede administrar con mayor frecuencia de acuerdo con las enfermedades que se va a tratar, por ejemplo, dos o tres veces por semana.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión, un vector de expresión que incluye el polinucleótido y una célula huésped que incluye el vector de expresión.

La característica técnica de la presente invención reside en el polipéptido de fusión explicado anteriormente, y el polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión, el vector de expresión que incluye el polinucleótido y la célula huésped que incluye el vector de expresión se pueden incluir dentro del alcance de la presente invención, y el tipo de
45 célula huésped no está limitado siempre que la expresión del polipéptido de fusión esté habilitada.

Aunque sin limitación, el polinucleótido puede ser, por ejemplo, uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41 que codifica 'GLP-1-hyFc8'; uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 42 que codifica 'GLP-1-hyFc9'; o uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 43 que codifica 'GLP-1-hyFc11'; y en forma específica, puede ser uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la
50 SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42; o uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 42.

Adicionalmente, en otra realización ejemplar, el polinucleótido puede ser uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 52 que codifica 'GLP-2-hyFc8'; uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 53 que codifica 'GLP-2-hyFc9'; o uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 54 que codifica 'GLP-2-hyFc11'; y en forma específica, puede ser uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54; o uno que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 54.
55

Considerando los codones preferidos por los organismos para expresar el polipéptido de fusión basado en la

degeneración del codón, se pueden ejecutar diversas modificaciones en el polinucleótido de fusión en la región codificadora dentro del alcance sin cambiar la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión.

[Efectos ventajosos de la invención]

5 El polipéptido de fusión de la presente invención tiene una vida media aumentada y una resistencia a la enzima DPP-4 mejorada en comparación con las de GLP-1 y GLP-2, y por lo tanto ha mejorado la eficacia farmacológica en el tratamiento de diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por quimioterapia anticáncer o síndrome de intestino corto, en comparación con los fármacos convencionales. Por consiguiente, el polipéptido de fusión de la presente invención se puede aplicar efectivamente a los fármacos.

Breve descripción de los dibujos

10 La FIG. 1, se relaciona con la preparación de GLP-1-hyFc5, muestra un diagrama esquemático y una secuencia de GLP-1-hyFc5.

La FIG. 2, que se relaciona con la preparación de GLP-1-hyFc9, muestra una secuencia y un diagrama esquemático de GLP-1- hyFc5 y GLP-1-hyFc9, respectivamente.

15 La FIG. 3, que se relaciona con la preparación de GLP-2-hyFc9, muestra un diagrama esquemático de GLP-2-hyFc5 y GLP-2-hyFc9, respectivamente.

La FIG. 4 muestra un gráfico que confirma los perfiles PK del péptido GLP-1 y GLP-1-hyFc5.

La FIG. 5, que se relaciona con los perfiles PK de GLP-1-hyFc5 y GLP-1-hyFc9, muestra los valores de las áreas bajo la curva (AUC) que ilustran la cantidad de proteínas que permanecen en la sangre y la concentración de fármaco en cada zona de tiempo.

20 La FIG. 6, que se relaciona con los perfiles PK de GLP-1-hyFc5, GLP-1-hyFc8, y GLP-1-hyFc9, muestra la cantidad de proteínas que permanecen en la sangre en cada zona de tiempo.

La FIG. 7, que se relaciona con la confirmación de la estabilidad sérica de GLP-1-hyFc5 y GLP-1-hyFc9, muestra los valores de las áreas bajo la curva (AUC) de un gráfico que ilustra la cantidad de proteínas que permanecen en la sangre en cada zona de tiempo.

25 La FIG. 8, que se relaciona con la confirmación de capacidad de resistencia de DPP-4 de GLP-1-hyFc5 y GLP-1-hyFc9, muestra los valores de las áreas bajo la curva (AUC) de un gráfico que ilustra la cantidad de proteínas que permanecen en la sangre en cada zona de tiempo de reacción.

30 La FIG. 9, que se relaciona con la confirmación de los perfiles PD de GLP-1-hyFc5 y GLP-1-hyFc9, muestra los valores de AUC obtenidos por la medición del cambio en la concentración de glucosa en la sangre como % de contenido AUC con respecto al del control negativo.

La FIG. 10, que se relaciona con la confirmación del efecto de pérdida del peso corporal de GLP-1-hyFc9, muestra la cantidad de cambio de peso corporal y la ingesta acumulada de alimentos.

La FIG. 11, que se relaciona con los resultados de comparación de los efectos inhibidores de ADCC de GLP-1-hyFc9 y GLP-1-ligador-IgG4-mut, confirma sus capacidades de unión a los receptores Fcγ.

35 La FIG. 12, que se relaciona con la confirmación de las actividades biológicas *in vitro* de GLP-2, GLP-2-hyFc5, y GLP-2-hyFc9, muestra los resultados de medición de la despolarización de membrana inducida por AMPc.

40 La FIG. 13, que se relaciona con los efectos terapéuticos de GLP-2-2G y GLP-2-hyFc9 sobre la enfermedad inflamatoria intestinal, muestra los cambios en el peso corporal, cantidad de expresión de TNF-α, y longitud del intestino delgado en un modelo experimental inducido por la enfermedad inflamatoria intestinal por administración de indometacina.

La FIG. 14 confirma los efectos de GLP-2-2G y GLP-2-hyFc9 sobre la inducción de la proliferación de células epiteliales intestinales.

La FIG. 15, que se relaciona con la confirmación del efecto de GLP-2-hyFc9 en la promoción del crecimiento del intestino delgado, muestra el peso del intestino delgado.

45 La FIG. 16, que se relaciona con la confirmación del efecto de GLP-2-hyFc9 en la reducción de la diarrea inducida por 5-FU.

La FIG. 17, que se relaciona con la confirmación del efecto de GLP-2-hyFc9 en la reducción de la letalidad, muestra que la tasa de morbilidad disminuida se produjo debido a la inducción de diarrea por 5-FU.

Descripción detallada de la invención

De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos, y la invención no se considera limitada por estos ejemplos.

5 Ejemplo 1: Preparación de la proteína de fusión GLP-hyFc

1-1 : Preparación de GLP-1-hyFc5, GLP-1-hyFc9, GLP-1-hyFc8, y GLP-1-hyFc11

10 Aunque el péptido-1 tipo glucagon (GLP-1) es una proteína efectiva para el tratamiento de la diabetes, tenía muchas limitaciones para desarrollarse como fármaco porque se escinde muy rápidamente *in vivo* mediante la enzima DPP-4 y tiene una vida media muy corta de aproximadamente 3 a 5 minutos, y por lo tanto se han hecho muchos intentos para aumentar la vida media *in vivo*.

15 Como tal, para reducir la escisión por la enzima DPP-4, se preparó un análogo de GLP-1 basado en GLP-1 (7-37) mediante la sustitución de alanina, el aminoácido en la posición 8, que es el sitio de escisión para la enzima DPP-4, con glicina (SEQ ID NO: 2). Posteriormente, el polipéptido de fusión GLP-1-hyFc5 se preparó mediante la fusión del polipéptido híbrido Fc 5 (hyFc5), que se preparó previamente en la Publicación de patente internacional Núm. WO 2008-147143 por los presentes inventores, al péptido análogo GLP-1 (FIG 1) La secuencia completa del polipéptido de fusión GLP-1-hyFc5 se muestra en la FIG. 1)

Además, en la presente invención, se intentó preparar un polipéptido de fusión que tiene excelentes actividades en otros aspectos mientras que también aumenta al vida media en comparación con la de GLP-1-hyFc5.

20 Específicamente, se intentó preparar un polipéptido de fusión que tiene excelentes actividades mientras que tiene una vida media mejorada controlando de forma diversa la región bisagra de IgD de hyFc5, y se confirmó que el aumento del número de aminoácidos en la IgD región bisagra podría satisfacer estas condiciones.

25 Por consiguiente, el hyFc9 (FIG. 2), que tiene una región bisagra que consiste en 40 aminoácidos (SEQ ID NO: 27) se preparó primero mediante el aumento del número de aminoácidos en la región bisagra del hyFc5, que tiene una región bisagra que consiste en 30 aminoácidos, y posteriormente se prepararon hyFc8, que tiene una región bisagra que consiste en 35 aminoácidos (SEQ ID NO: 26), y el hyFc11, que tiene una región bisagra que consiste en 49 aminoácidos (SEQ ID NO: 28), respectivamente. Adicionalmente, se prepararon los polipéptidos de fusión GLP-1-hyFc9 (SEQ ID NO: 31), GLP-1-hyFc8 (SEQ ID NO: 30), y GLP-1-hyFc11 (SEQ ID NO: 32) mediante la conjugación del péptido análogo de GLP-1 a cada uno del hyFc9, el hyFc8, y el hyFc11, respectivamente.

1-2 : Preparación de GLP-2-hyFc5, GLP-2-hyFc9, GLP-2-hyFc8, y GLP-2-hyFc11

30 Como es el caso con GLP-1, el péptido-2 tipo glucagon (GLP-2) también tuvo muchas limitaciones para desarrollarse como fármaco porque se escinde muy rápidamente *in vivo* por la enzima DPP-4 y tiene una vida media muy corta de aproximadamente 7 minutos. Para aumentar la vida media *in vivo* de GLP-2, alanina, el aminoácido en la posición 2, que es el sitio de escisión para la enzima DPP-4, se sustituye con glicina (péptido GLP-2-2G, SEQ ID) NO: 45). Aunque el péptido GLP-2-2G sustituido se prepara en una formulación de una vez al día para tratar el síndrome del intestino corto en adultos, aún es necesario desarrollar un análogo de GLP-2 que tenga una vida media mucho más larga que el GLP-2-2G GLP-2-2G sustituido, considerando que el síndrome del intestino corto se debe tratar continuamente. Para este propósito, el polipéptido de fusión GLP-2-hyFc5 se preparó mediante la fusión del polipéptido hyFc5, que fue preparado previamente en la Publicación de patente internacional Núm. WO 2008-147143 por los presentes inventores, con el péptido análogo GLP-2-2G (FIG 3). Además, se intentó preparar un polipéptido de fusión que tenga excelentes actividades al mismo tiempo que tenga una vida media mejorada controlando de forma diversa la región de bisagra de IgD con la longitud total de 64 aminoácidos. Específicamente, hyFc9, que tiene una región bisagra que consiste en 40 aminoácidos, se preparó mediante el aumento de los aminoácidos en la región bisagra del hyFc5, que tiene una región bisagra que consiste en 30 aminoácidos, y posteriormente el polipéptido de fusión GLP-2-hyFc9 se preparó mediante la conjugación del péptido GLP-2-2G al mismo (FIG. 3, SEQ ID NO: 48). Adicionalmente, se prepararon el hyFc8, que tiene una región bisagra que consiste en 35 aminoácidos, y elhyFc11, que tiene una región bisagra que consiste en 49 aminoácidos, y posteriormente se prepararon los polipéptidos de fusión GLP-2-hyFc8 (SEQ ID NO: 47) y GLP-2-hyFc11 (SEQ ID NO: 49), mediante la conjugación del péptido GLP-2-2G a cada uno de ellos.

Ejemplo 2: Confirmación del perfil PK de la proteína de fusión GLP-hyFc

2-1: Confirmación del perfil PK de GLP-1-hyFc5

50 Para confirmar el perfil farmacocinético (perfil PK) del polipéptido de fusión GLP-1-hyFc5 así preparado, los experimentos se realizaron de la siguiente manera usando el GLP-1 sintetizado como control.

A las ratas macho Sprague Dawley (4 ratas/grupo) se les administró por vía intravenosa las proteínas respectivas, GLP-

1 y GLP-1-hyFc5. Se recogieron muestras de sangre antes de la administración y después de la administración a las 0,08-, 0,16-, 0,5-, 1-, 2-, 4-, 6-, 12-, 24-, 48-, 72- y 96 horas, respectivamente. Las muestras de sangre se almacenaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para aglutinación. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener suero de cada muestra y posteriormente se almacenaron en un ultracongelador. Las muestras se cuantificaron por dilución para analizarlas en una posición en una línea recta de curva estándar usando el kit GLP-1 (ALPCO, Cat. No. 43-GP1HU-E01).

Como resultado, como se muestra en la FIG. 4, el péptido que incluye GLP-1 solo, que no se fusionó con el polipéptido hyFc, tenía una vida media corta de 4 minutos, mientras que el polipéptido GLP-1-hyFc5, que se fusionó con GLP-1 y hyFc5, mostró tener una vida media con un aumento de aproximadamente 116 veces (> 8 horas).

2-2: Confirmación del perfil PK de GLP-1-hyFc9

El perfil de PK se confirmó mediante la comparación de la vida media del polipéptido de fusión GLP-1-hyFc9 con el del polipéptido de fusión GLP-1-hyFc5 preparado en el Ejemplo 1.

A las ratas macho Sprague Dawley (4 ratas/grupo) se les administró por vía subcutánea las proteínas respectivas. Se recogieron muestras de sangre antes de la administración y después de la administración a las 2, 6, 12, 26, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas, respectivamente. Las muestras de sangre se almacenaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para aglutinación. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener suero de cada muestra y posteriormente se almacenaron en un ultracongelador. Las muestras se cuantificaron por dilución para analizarlas en una posición en línea recta de curva estándar usando el kit GLP-1 (IBL, Cat. No. 27784A).

Los resultados se indicaron en términos de la cantidad de proteína restante en la sangre para cada zona de tiempo y el valor del área bajo la curva (AUC). Como se muestra en la FIG. 5, GLP-1-hyFc9 tenía un valor de AUC aproximadamente 12 veces mayor en comparación con el de GLP-1-hyFc5. Sobre la base de estos resultados, se confirmó que GLP-1-hyFc9 tiene una vida media significativamente mayor en comparación con la de GLP-1-hyFc5, y por lo tanto se espera que tenga una eficacia farmacológica más efectiva.

2-3 Confirmación del perfil PK de GLP-1-hyFc8

El perfil PK del polipéptido de fusión GLP-1-hyFc8 se confirmó mediante la comparación de la vida media del polipéptido de fusión GLP-1-hyFc8 con la del polipéptido de fusión GLP-1-hyFc9. Se realizaron experimentos para GLP-1-hyFc5, GLP-1-hyFc9 y GLP-1-hyFc8 de la misma manera que en el Ejemplo 2-2.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 6, se confirmó que GLP-1-hyFc9 y GLP-1-hyFc8 tienen un nivel similar de perfiles PK, y GLP-1-hyFc8 mostró un nivel ligeramente más alto. Se demostró que estos niveles eran mucho más altos en comparación con los del control, GLP-1-hyFc5. Sobre la base de estos resultados, se confirmó que GLP-1-hyFc8 tiene una eficacia farmacológica más efectiva con el aumento de la vida media.

2-4: Confirmación de los perfiles de PK de GLP-2-hyFc5 y GLP-2-hyFc9

Para confirmar el perfil farmacocinético (perfil PK) de los polipéptidos de fusión GLP-2-hyFc5 y GLP-2-hyFc9 preparados anteriormente, los experimentos se realizaron de la siguiente manera.

A las ratas macho Sprague Dawley (3 ratas/grupo) se les administró por vía subcutánea las proteínas respectivas (péptido GLP-2-2G, GLP-2-hyFc5, y GLP-2-hyFc9). Se recogieron muestras de sangre antes de la administración y después de la administración a las 0,08-, 0,16-, 0,5-, 2-, 4-, 8-, 24-, 48-, 96-, 120-, y 168 horas, respectivamente. Las muestras de sangre se almacenaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para aglutinación. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener suero de cada muestra y posteriormente se almacenaron en un ultracongelador. Las muestras se cuantificaron por dilución para analizarlas en una posición en línea recta de curva estándar usando el kit GLP-2 (Millipore, Cat. No. EZGLP2-37K). Como resultado, el péptido que incluye el péptido GLP-2-2G solo, que no se fusionó con una proteína Fc, se demostró que tiene una vida media corta de 1,2 horas, mientras que las proteínas de fusión GLP-2-hyFc5 y GLP-2-hyFc9 tienen vida media de 44 y 65 horas, respectivamente, de este modo se muestra un aumento de 36 y 54 veces, en comparación con el de GLP-2-2G. En particular, se demostró que GLP-2-hyFc9 tenía un aumento de aproximadamente 1,5 veces en comparación con el de GLP-2-hyFc5.

Ejemplo 3: Prueba de actividad biológica de la proteína de fusión GLP-hyFc

3-1: Confirmación de la estabilidad sérica de GLP-1-hyFc9

Se confirmaron varios efectos adicionales de GLP-1-hyFc9, entre los polipéptidos de fusión con excelentes perfiles de PK. GLP-1-hyFc5 se utilizó como grupo de comparación. Para confirmar la estabilidad de GLP-1-hyFc5 y GLP-1-hyFc9 sobre los factores de descomposición en los sueros, la prueba de estabilidad se realizó en sueros de ratas.

En primer lugar, se diluyeron dos materiales de prueba con suero de rata, y cada muestra se hizo reaccionar a 37 °C durante 0-, 6-, 10-, 24- y 48 horas, y cada material se cuantificó mediante un ensayo ELISA.

5 Los resultados se indicaron en términos de cantidad de proteína restante en la sangre para cada zona de tiempo y el valor del área bajo la curva (AUC). Como se muestra en la FIG. 7, GLP-1-hyFc9 tenía un valor de AUC aproximadamente 1,2 veces mayor en comparación con el de GLP-1-hyFc5. Sobre la base de estos resultados, se confirmó que GLP-1-hyFc9 también tenía una estabilidad sérica significativamente mayor en comparación con la de GLP-1-hyFc5.

3-2: Confirmación de la resistencia de DPP-4 de GLP-1-hyFc9

La prueba de resistencia DPP-4 se realizó para confirmar la resistencia de GLP-1-hyFc5 y GLP-1-hyFc9 a DPP-4 (Sigma, Cat No. D4943-1VL), que es una enzima metabólica principal, y la subsiguiente estabilidad de los mismos.

10 Se añadieron dos materiales de prueba a un termostato mantenido a 37 ° C, se hicieron reaccionar durante 0, 2, 8, 24 y 48 horas, y cada material se cuantificó.

15 Los resultados se indicaron en términos de la cantidad de proteína restante en la sangre para cada zona de tiempo y el valor del área bajo la curva (AUC). Como se muestra en la FIG. 8, GLP-1-hyFc9 tenía una resistencia a DPP-4 aproximadamente 7 veces mayor en comparación con la de GLP-1-hyFc5. Sobre la base de estos resultados, se confirmó que GLP-1-hyFc9 tiene una estabilidad significativamente mayor a la enzima DPP-4, que puede escindir GLP-1).

3-3: Confirmación del perfil PD de GLP-1-hyFc9

Para confirmar los perfiles farmacocinéticos (perfiles PK) de GLP-1-hyFc5 y GLP-1-hyFc9, los experimentos se realizaron de la siguiente manera.

20 A 5 ratones CD-1 (10 ratones/grupo) se les administró por vía subcutánea las proteínas respectivas y posteriormente se administró glucosa en los días 0, 1, 2, 4 y 8 a partir de entonces y se midió el cambio en los niveles de glucosa en sangre para confirmar el efecto hipoglucemiante.

25 Con respecto al resultado, el cambio en los niveles de glucosa en sangre se midió en cada fecha de medición de 1 minuto a 180 minutos después de la administración de glucosa y se obtuvieron los valores de AUC para cada día de experimento, y se indicaron como el contenido de AUC (%) de GLP-1-hyFc5 y GLP-1-hyFc9 en relación con el control negativo (vehículo).

Como resultado, como se muestra en la FIG. 9, se confirmó que GLP-1-hyFc5 comenzó a perder el efecto hipoglucémico desde el Día 2 y se normalizó, mientras que GLP-1-hyFc9 mantuvo los niveles de glucosa en sangre hasta el Día 8 en un nivel bajo. Estos resultados indican que GLP-1-hyFc9 puede retener el efecto hipoglucémico hasta el Día 8.

30 3-4: Confirmación del efecto reductor del peso de GLP-1-hyFc9

La disposición farmacocinética (DP, ingesta acumulada de alimentos y efecto de pérdida de peso) de GLP-1-hyFc9 en un modelo de enfermedad ob/ob se confirmó en relación con el control negativo (vehículo).

35 A los ratones ob/ob (10 ratones/grupo) se les administró repetidamente por vía subcutánea una vez por semana la proteína y se midieron los cambios en el peso corporal y la ingesta acumulada de alimentos cada semana. Para el peso corporal, se indica la diferencia obtenida mediante la sustracción del valor del cambio en el peso corporal del control negativo del valor del cambio en el peso corporal por grupo, y para la ingesta acumulada de alimentos, asimismo, se indica la diferencia con respecto al control negativo (FIG. 10). En consecuencia, GLP-1-hyFc9 exhibió un efecto significativo de pérdida de peso corporal y un efecto de reducción de la ingesta de alimentos en términos del cambio en el peso corporal y la ingesta acumulada de alimentos, en comparación con el control negativo, y que los efectos fueron en un forma dependiente de la dosis.

40 En resumen, como se muestra en la Tabla 2 a continuación, GLP-1-hyFc9 mostró efectos mejorados en comparación con GLP-1-hyFc5.

Tabla 2

		hyFc5	hyFc9
In-vitro	Estabilidad de suero (rata)	++	+++
	Capacidad de resistencia a DPP4	+	++++
In-vivo	Estudio PK (rata)	+	++++
	IPGTT (ratón)	+	+++

3-5: Comparación de actividad inhibitoria de ADCC GLP-1-ligador-IgG4-mut

5 Además, para el polipéptido de fusión GLP-1-hyFc9 que exhibe excelentes efectos en varios aspectos a través de ejemplos, se confirmó la superioridad en comparación con el inhibidor de ADCC con el de los polipéptidos de fusión conocidos en la técnica.

GLP-1-ligador-IgG4-mut divulgado en la patente U.S. Núm. 7,452,966 B2 se usó como grupo de comparación, que es un polipéptido destinado a inhibir la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) debido a tres mutaciones en la región IgG4.

10 Debido a que GLP-1-ligador-IgG4-mut y GLP-1-hyFc9 de la presente invención incluyen estructuralmente los dominios CH2-CH3 de la IgG4, no existe ningún problema de seguridad con respecto a la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) involucrada en el mismo.

15 Sin embargo, para confirmar la seguridad de ADCC, la afinidad de unión a los receptores Fcy que desempeñan un papel importante en la inducción de ADCC, y para este propósito, se realizó una prueba de afinidad de unión usando resonancia de pasmón superficial (SPR, Bio-rad, #Proteon XPR36).

Primero, los ligandos se inmovilizaron mediante el flujo de los receptores Fc en cada canal de chips de bio-rad, que se acoplaron con amina mediante una reacción NHS/EDC, usando un tampón de acetato. Como concepto del control negativo, se hizo fluir una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween 20. Se midió la afinidad de unión de cada uno de los chips, a los que se unió cada receptor Fcy, mediante el flujo de cada material de prueba.

20 Como resultado, como se muestra en la FIG. 11, GLP-1-ligador-IgG4-mut mostró una mayor capacidad de unión a los principales receptores Fcy, que inducen ADCC, aunque se modificaron varios sitios de aminoácidos para eliminar las funciones efectoras restantes de la región Fc de inmunoglobulina, en comparación con GLP-1-hyFc9, y por esta razón, se confirmó que tiene citotoxicidad potencial. Por el contrario, GLP-1-hyFc9 mostró una menor capacidad de unión con todos los receptores Fcy, en comparación con GLP-1-ligador-IgG4-mut, y a partir de esto, se confirmó que GLP-1-hyFc9 es más seguro en el caso de una administración del fármaco a largo plazo.

3-6: Prueba de actividad biológica asociada a inflamación de GLP-2-hyFc9

Junto con GLP-1-hyFc9, GLP-2-hyFc9 se sometió a una prueba de actividad biológica. Debido a que GLP-2-hyFc9, a pesar de que tiene una vida media significativamente aumentada, puede reducir la actividad biológica del péptido GLP-2-2G mismo debido a la fusión con hyFc9, se examinó la actividad biológica.

30 A fin de examinar la actividad biológica de GLP-2-hyFc9, se midió el nivel de AMPc intracelular, que aumenta después de la estimulación de GLP-2-hyFc9. Las células 293 que expresan GLP-2R se cultivaron en una placa de 96 pocillos en una cantidad de 6×10^4 células. En 24 horas, las células se trataron con las proteínas de fusión a concentraciones de 0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 100 nM y 300 nM, y se midió la despolarización de la membrana inducida por el aumento de AMPc intracelular usando un colorante fluorescente de potencial de membrana. Como resultado, como se muestra en la FIG. 12, se confirmó que se redujo notablemente la actividad biológica de la proteína de fusión GLP-2-hyFc5 que muestra una actividad de 27% cuando la actividad del péptido GLP-2-2G se ajustó a 100%, mientras que la proteína de fusión GLP-2-hyFc9 mostró una actividad de 98%, por lo tanto no mostró reducción en su actividad biológica relacionada con la inflamación, incluso después de la fusión con hyFc9.

3-7: Confirmación del efecto terapéutico de GLP-2-hyFc9 sobre la enfermedad inflamatoria intestinal

40 GLP-2-hyFc9 se administró por vía subcutánea a un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por

indometacina y se comparó el efecto de la mejora. Las ratas macho Sprague Dawley (6 ratas/grupo) se trataron con indometacina el Día 1 y Día 2 a una concentración de 9 mg/kg para inducir la enfermedad inflamatoria intestinal. GLP-2-2G, como grupo de comparación, se administró dos veces al día hasta un total de 12 veces a una concentración de 50 nmol/kg desde el Día 3 hasta el Día 8, mientras que GLP-2-hyFc9 se administró una vez cada dos días a un total de 3 veces a una concentración de 50 nmol/kg y las ratas se sometieron a autopsia el Día 9. Los cambios en el peso corporal, la longitud del intestino delgado y el nivel de expresión de citoquinas inflamatorias (TNF- α) se compararon en cada grupo, y se compararon los efectos terapéuticos sobre los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 13, se demostró que el peso corporal y la longitud del intestino delgado disminuyeron significativamente, mientras que el nivel de expresión de citoquinas inflamatorias (TNF- α) aumentó por el tratamiento con indometacina. Sin embargo, en el grupo tratado con GLP-2-hyFc9 se demostró una reducción menor en el peso corporal, una disminución en el nivel de expresión de citoquinas inflamatorias (TNF- α) y también un aumento en la longitud del intestino delgado, lo que confirma el efecto terapéutico de GLP-2-hyFc9 en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. En particular, GLP-2-hyFc9, aunque se administró a un nivel de un cuarto del nivel de GLP-2-2G, mostró un efecto más significativo.

3-8: Confirmación del efecto de GLP-2-hyFc sobre la inducción de la proliferación de las células epiteliales intestinales

Se examinó el efecto de GLP-2-hyFc9 sobre la inducción de la proliferación de células epiteliales intestinales. El péptido GLP-2-2G se utilizó como grupo de comparación. Se sabe que GLP-2 aumenta la producción de factores de crecimiento (IGF-1, VEGF, EGF, etc.) al actuar sobre los fibroblastos (células efectoras), y el aumento de los factores de crecimiento promueve la proliferación de las células epiteliales intestinales. En consecuencia, se realizó un experimento para confirmar el efecto de GLP-2-hyFc9 sobre la inducción de la proliferación de las células epiteliales intestinales. Las células CCD-18co se cultivaron en un medio sin suero durante 24 horas, se trataron con GLP-2-2G y GLP-2-hyFc9 a concentraciones de 50 nM, 100 nM y 250 nM, y se cultivaron durante 24 horas. Las células Caco-2 se trataron con el medio de cultivo celular (medio acondicionado; CM), se cultivaron durante 3 días y se midió la proliferación celular Caco-2 50 usando EZ Cytos (Dogen, Cat.No.EZ-1000). Como resultado, como se muestra en la FIG. 14, la capacidad de GLP-2-hyFc9 de promover la proliferación celular de Caco-2 fue similar a la del péptido GLP-2-2G. Es decir, se demostró que la actividad biológica de GLP-2, incluso después de una fusión con hyFc9, se mantuvo a un nivel similar al de GLP-2 nativo.

3-9: Confirmación del efecto intestinotrófico de GLP-2-hyFc9

Para confirmar la característica farmacodinámica de GLP-2-hyFc9, es decir, el efecto intestinotrófico, se realizó un experimento de la siguiente manera. Se trataron ratas macho Sprague Dawley (8 ratas/grupo) con GLP-2-hyFc9 una vez al día durante 5 días a concentraciones de 0 nmol/kg, 1 nmol/kg, 3 nmol/kg, 10 nmol/kg, 30 nmol/kg., 100 nmol/kg y 300 nmol/kg, se sometieron a autopsia para medir el peso de su intestino delgado y, por lo tanto, se confirmó el efecto intestinotrófico de GLP-2-hyFc9. Como se muestra en la FIG. 15, el grupo tratado con GLP-2-hyFc9 mostró un aumento del intestino delgado de una manera dependiente de la dosis, y se demostró que ED₅₀ es 14,2 nmol/kg/día.

3-10: Confirmación del efecto de GLP-2-hyFc9 sobre la reducción de la diarrea y letalidad

El irinotecano o 5-FU, entre los medicamentos de quimioterapia anticáncer utilizados para matar las células cancerosas, puede inducir atrofia vellosa al destruir las células de las criptas, que forman las vellosidades de las células intestinales, y esto puede llevar a diarrea mortal. Debido a que la atrofia vellosa y la diarrea inducida por los fármacos de la quimioterapia anticáncer pueden afectar la letalidad, se realizó un experimento para confirmar si el tratamiento con GLP-2-hyFc9 puede prevenir la diarrea y la letalidad inducida por los fármacos de la quimioterapia anticáncer. Se trataron ratas macho Sprague Dawley (15 ratas/grupo) con 5-FU una vez al día hasta un total de cuatro veces a una concentración de 75 mg/kg para inducir diarrea. Las ratas se trataron con GLP-2-hyFc9 a un total de cuatro veces a una concentración de 80 nmol/kg/día o una vez a una concentración de 320 nmol/kg/día, y se examinó la puntuación de diarrea durante 10 días, de este modo se confirmó la letalidad. Como resultado, como se muestra en la FIG. 16, el grupo tratado cuatro veces con GLP-2-hyFc9 a una concentración de 80 nmol/kg/día mostró una disminución en la puntuación de diarrea en comparación con el grupo no tratado, y el grupo tratado una vez con GLP-2-hyFc9 a una concentración de 320 nmol/kg/día mostró una disminución significativa en la puntuación de diarrea en comparación con el grupo tratado cuatro veces con GLP-2-hyFc9 a una dosis baja. Además, la letalidad inducida por 5-FU (27%) se redujo en un 20% a 6,7% en el grupo tratado con GLP-2-hyFc9 (FIG 17). Por lo tanto, se confirmó que GLP-2-hyFc9 tiene el efecto de prevenir la diarrea inducida por la quimioterapia anticáncer.

<110> Genexine, Inc.

<120> Polipéptido de fusión que comprende GLP y Fc híbrido de inmunoglobulina y su uso

<130> OPA15319-PCT

<150> KR 10-2014-0195793

<151> 2014-12-31

<160> 54

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-37) (A8G)

<400> 2

ES 2 757 812 T3

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

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

<210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo GLP-1(7-37) (A8V)

<400> 3

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

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

<210> 4
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo GLP-1(7-37) (G22E)

<400> 4

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

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

<210> 5
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo GLP-1(7-37) (R36G)

<400> 5

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

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

<210> 6
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 757 812 T3

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-37) (A8G/G22E)

<400> 6

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

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

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-37) (A8V/G22E)

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-37) (A8G/R36G)

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-37) (A8V/R36G)

<400> 9

ES 2 757 812 T3

<400> 13

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

<210> 14
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo GLP-1(7-36) (A8G)

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo GLP-1(7-36) (A8V)

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo GLP-1(7-36) (G22E)

<400> 16
 50

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

<210> 17
 <211> 30

ES 2 757 812 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-36) (R36G)

<400> 17

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

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

<210> 18

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-36) (A8G/G22E)

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-36) (A8V/G22E)

<400> 19

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

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

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-36) (A8G/R36G)

<400> 20

ES 2 757 812 T3

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

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

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-36) (A8V/R36G)

<400> 21

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

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

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-36) (G22E/R36G)

<400> 22

His Ala 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
 20 25 30

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-36) (A8G/G22E/R36G)

<400> 23

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
 20 25 30

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 757 812 T3

<220>

<223> Análogo GLP-1(7-36) (A8V/G22E/R36G)

<400> 24

His Val 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
 20 25 30

<210> 25

<211> 64

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
 1 5 10 15

Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 50 55 60

<210> 26

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys
 1 5 10 15

Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro
 20 25 30

Glu Cys Pro
 35

<210> 27

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

ES 2 757 812 T3

Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly
1 5 10 15

Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg
20 25 30

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
35 40

<210> 28
<211> 49
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro
1 5 10 15

Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu
20 25 30

Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys
35 40 45

<210> 29
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región CH3 y CH4 híbridas de IgD & IgG4

<400> 29

ES 2 757 812 T3

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

<210> 30
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> GLP-1-hyFc8

<400> 30

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

ES 2 757 812 T3

Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
 35 40 45

Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu
 50 55 60

Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 65 70 75 80

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

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 115 120 125

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 130 135 140

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 145 150 155 160

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

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

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 210 215 220

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 275 280

<210> 31
 <211> 286
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> GLP-1-hyFc9

<400> 31

ES 2 757 812 T3

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

<210> 32
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> GLP-1-hyFc11

<400> 32

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

ES 2 757 812 T3

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

<210> 33
 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 757 812 T3

<400> 33
cacgccgaag gcaccttcac cagcgacgtg agcagctacc tggaaggcca ggctgccaag 60
gagttcatcg cctggctggt gaaaggcaga ggc 93

<210> 34
 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo GLP-1(7-37) (A8G)

<400> 34
cacggcgaag gcaccttcac cagcgacgtg agcagctacc tggaaggcca ggctgccaag 60
gagttcatcg cctggctggt gaaaggcaga ggc 93

<210> 35
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 35
cacgccgaag gcaccttcac cagcgacgtg agcagctacc tggaaggcca ggctgccaag 60
gagttcatcg cctggctggt gaaaggcaga 90

<210> 36
 <211> 192
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 36
agatggcccg agagccctaa ggcccaggcc agctccgtgc ccacagctca gccacaggct 60
gaggggaagcc tcgccaaggc aacgactgcg cgggccacta cgcgcaacac cggccgcggc 120
ggcgaggaga agaagaagga gaaggagaag gaggagcagg aggagcgcga gaccaagacc 180
cccgagtgcc cc 192

<210> 37
 <211> 105
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 37

ES 2 757 812 T3

gcgccggcca ctacgcgcaa caccggccgc ggcggcgagg agaagaagaa ggagaaggag 60

aaggaggagc aggaggagcg cgagaccaag acccccgagt gcccc 105

<210> 38
<211> 120
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 38

gccaaaggcaa cgactgcgcc ggccactacg cgcaacaccg gccgcggcgg cgaggagaag 60

aagaaggaga aggagaagga ggagcaggag gagcgcgaga ccaagacccc cgagtgcccc 120

<210> 39
<211> 147
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 39

gctcagccac aggctgaggg aagcctcgc aaggcaacga ctgcgccggc cactacgcgc 60

aacaccggcc gcggcggcga ggagaagaag aaggagaagg agaaggagga gcaggaggag 120

cgcgagacca agacccccga gtgcccc 147

<210> 40
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región CH2 y CH3 híbrida de IgD e IgG4

<400> 40

ES 2 757 812 T3

```
agccacaccc agcccctggg cgtgttcctg ttcccccca agccaagga caccctgatg      60
atcagccgca ccccgaggt gacctgctg gtcgtggatg tgagccagga agatcccgaa      120
gtgcagttca actggtacgt ggatggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga      180
gaagagcagt tcaactccac ctacagagtg gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac      240
tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtgtccaaca aaggcctgcc cagctccatc      300
gagaagacca tcagcaaagc caaaggccag cccagagaac cccaggtgta caccctgcct      360
cccagccagg aagagatgac caagaaccag gtgtccctga cctgcctggt gaaaggcttc      420
taccacagcg acatcgccgt ggagtgggaa agcaacggcc agcccgagaa caattacaag      480
acaacccctc ccgtgctgga tagcgatggc agcttctttc tgtacagcag actgaccgtg      540
gacaagagca gatggcagga aggcaacgtg ttcagctgca gcgtgatgca cgaagccctg      600
cacaaccact acaccagaa gagcctgtcc ctgagcctgg gcaag      645
```

<210> 41
<211> 843
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> GLP-1-hyFc8

<400> 41

ES 2 757 812 T3

cacggcgaag gcacctcac cagcgacgtg agcagctacc tggaggcca ggctgccaag	60
gagttcatcg cctggctggt gaaaggcaga ggcgcgccgg cactacgcg caacaccggc	120
cgcgcgggcg aggagaaga gaaggagaag gagaaggagg agcaggagga gcgagagacc	180
aagacccccg agtgccccag ccacaccag cccctgggcg tgttcctgtt ccccccaag	240
cccaaggaca ccctgatgat cagccgcacc cccgaggtga cctgcggtgt cgtggatgtg	300
agccaggaag atcccgaagt gcagttcaac tggtagctgg atggcggtga agtgcaaac	360
gccaaacca agcccagaga agagcagttc aactccacct acagagtggg gagcgtgctg	420
accgtgctgc accagagctg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt gtccaacaaa	480
ggcctgcca gctccatoga gaagaccatc agcaaagcca aaggccagcc cagagaacct	540
caggtgtaca ccctgcctcc cagccaggaa gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc	600
tgcctggtga aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggaaag caacggccag	660
cccgagaaca attacaagac aaccctccc gtgctggata gcgatggcag cttctttctg	720
tacagcagac tgacctgga caagagcaga tggcaggaag gcaacgtgtt cagctgcagc	780
gtgatgcacg aagccctgca caaccactac acccagaaga gcctgtccct gagcctgggc	840
aag	843

<210> 42
 <211> 858
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> GLP-1-hyFc9

<400> 42

ES 2 757 812 T3

cacggcgaag gcaccttcac cagcgacgtg agcagctacc tggaaggcca ggctgccaaag	60
gagttcatcg cctggctggt gaaaggcaga ggcgccaaagg caacgactgc gccggccact	120
acgcgcaaca ccggccgcgg cggcgaggag aagaagaagg agaaggagaa ggaggagcag	180
gaggagcgcg agaccaagac ccccgagtgc cccagccaca cccagcccct gggcgtgttc	240
ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagcc gcacccccga ggtgacctgc	300
gtggtcgtgg atgtgagcca ggaagatccc gaagtgcagt tcaactggta cgtggatggc	360
gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagccc agagaagagc agttcaactc cacctacaga	420
gtggtgagcg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	480
aaggtgtcca acaaaggcct gccagctcc atcgagaaga ccatcagcaa agccaaaggc	540
gaaagcaacg gccagcccga gaacaattac aagacaaccc ctcccgtgct ggatagcgat	720
ggcagcttct ttctgtacag cagactgacc gtggacaaga gcagatggca ggaaggcaac	780
gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaagcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg	840
tcctgagcc tgggcaag	858

- <210> 43
- <211> 885
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> GLP-1-hyFc11

- <400> 43

ES 2 757 812 T3

```

cacggcgaag gcaccttcac cagcgacgtg agcagctacc tggaggcca ggctgccaaag      60
gagttcatcg cctggctggt gaaaggcaga ggcgctcagc cacaggctga ggaagcctc      120
gccaaaggcaa cgactgcgcc ggccactacg cgcaacaccg gccgcggcgg cgaggagaag      180
aagaaggaga aggagaagga ggagcaggag gagcgogaga ccaagacccc cgagtgcccc      240
agccacaccc agcccctggg cgtgttcctg ttcccccca agccaagga caccctgatg      300
atcagccgca cccccgaggt gacctgcgtg gtcgtggatg tgagccagga agatccgaa      360
gtgcagttca actggtacgt ggatggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga      420
gaagagcagt tcaactccac ctacagagtg gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac      480
tggtgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtgtccaaca aaggcctgcc cagctccatc      540
gagaagacca tcagcaaagc caaaggccag cccagagaac cccaggtgta caccctgcct      600
cccagccagg aagagatgac caagaaccag gtgtccctga cctgcctggt gaaaggcttc      660
taccacgagc acatgcgctg ggagtgggaa agcaacggcc agcccagaaa caattacaag      720
acaaccctc ccgtgctgga tagcgtggc agcttcttcc tgtacagcag actgaccgtg      780
gacaagagca gatggcagga aggcaacgtg ttcagctgca gcgtgatgca cgaagcctg      840
cacaaccact acaccagaa gagcctgtcc ctgagcctgg gcaag      885
  
```

<210> 44
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

```

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

```

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

Asp

<210> 45
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> análogo de GLP-2ue (A2G)

<400> 45

ES 2 757 812 T3

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

Asp

<210> 46
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> análogo de GLP-2 (A2V)
<400> 46

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

Asp

<210> 47
<211> 283
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> GLP-2-hyFc8
<400> 47

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30
Asp Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys
35 40 45
Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr

ES 2 757 812 T3

50						55						60			
Pro	Glu	Cys	Pro	Ser	His	Thr	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
65					70					75					80
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				85					90					95	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn
			100					105					110		
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
		115					120					125			
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
		130				135					140				
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
145					150					155					160
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				165					170					175	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu
			180					185						190	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
		195					200					205			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
	210					215					220				
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
225					230					235					240
Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly
				245					250					255	
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
			260					265					270		
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
		275					280								

<210> 48
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> GLP-2-hyFc9

<400> 48

ES 2 757 812 T3

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

<210> 49
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 757 812 T3

<223> GLP-2-hyFc11

<400> 49

```

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

```

ES 2 757 812 T3

<210> 50
<211> 99
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 50

cacgcgacg gcagcttcag cgacgagatg aacaccatcc tggacaacct ggccgctaga 60
gacttcatca actggctgat ccagaccaag atcaccgat 99

<210> 51
<211> 99
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> análogo de GLP-2ue (A2G)
<400> 51

cacggcgacg gcagcttcag cgacgagatg aacaccatcc tggacaacct ggccgctaga 60
gacttcatca actggctgat ccagaccaag atcaccgat 99

<210> 52
<211> 849
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> GLP-2-hyFc8
<400> 52

ES 2 757 812 T3

cacggcgacg gcagcttcag cgacgagatg aacaccatcc tggacaacct ggccgctaga	60
gacttcatca actggctgat ccagaccaag atcaccgatg cgccggccac tacgcgcaac	120
accggcccgcg gcggcgagga gaagaagaag gagaaggaga aggaggagca ggaggagcgc	180
gagaccaaga cccccgagtg ccccagccac acccagcccc tgggcgtggt cctgttcccc	240
cccaagccca aggacaccct gatgatcagc cgcacccccg aggtgacctg cgtggtcgtg	300
gatgtgagcc aggaagatcc cgaagtgcag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaagtg	360
cacaacgccca agaccaagcc cagagaagag cagttcaact ccacctacag agtggtgagc	420
gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtgtcc	480
aacaaagcc tgcccagctc catcgagaag accatcagca aagccaaagg ccagcccaga	540
gaaccccagg tgtacaccct gcctcccagc caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc	600
ctgacctgcc tggtgaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg gaaagcaac	660
ggccagcccg agaacaatta caagacaacc cctcccgtgc tggatagcga tggcagcttc	720
tttctgtaca gcagactgac cgtggacaag agcagatggc aggaaggcaa cgtgttcagc	780
tgcagcgtga tgcaogaagc cctgcacaac cactacaacc agaagagcct gtccttgagc	840
ctgggcaag	849

<210> 53
 <211> 864
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> GLP-2-hyFc9

<400> 53

ES 2 757 812 T3

cacggcgacg gcagcttcag cgacgagatg aacaccatcc tggacaacct ggccgctaga 60
gacttcatca actggctgat ccagaccaag atcaccgatg ccaaggcaac gactgcgccg 120
gccactacgc gcaacaccgg ccgcgccggc gaggagaaga agaaggagaa ggagaaggag 180
gagcaggagg agcgcgagac caagaccccc gagtgcccca gccacacca gccctgggc 240
gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagccgac ccccgaggtg 300
acctgcgtgg tcgtggatgt gagccaggaa gatcccgaag tgcagttcaa ctggtacgtg 360
gatggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aagagcagtt caactccacc 420
tacagagtgg tgagcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 480
aagtcaagg tgtccaacaa aggcctgccc agctccatcg agaagaccat cagcaaagcc 540
aaaggccagc ccagagaacc ccaggtgtac accctgcctc ccagccagga agagatgacc 600
aagaaccagg tgtccctgac ctgcctgggtg aaaggttctt accccagcga catcgccgtg 660
gagtgggaaa gcaacggcca gcccgagaac aattacaaga caaccctcc cgtgctggat 720
agcgatggca gcttcttct gtacagcaga ctgaccgtgg acaagagcag atggcaggaa 780
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaagccctgc acaaccacta caccagaag 840
agcctgtccc tgagcctggg caag 864

<210> 54
<211> 891
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> GLP-2-hyFc11

<400> 54

cacggcgacg gcagcttcag cgacgagatg aacaccatcc tggacaacct ggccgctaga 60
gacttcatca actggctgat ccagaccaag atcaccgatg ctgagccaca ggctgagggg 120
agcctcgcca aggcaacgac tgcgcccggc actacgcgca acaccggccg cggcggcgag 180
gagaagaaga aggagaagga gaaggaggag caggaggagc gcgagaccaa gacccccgag 240
tgccccagcc acaccagcc cctgggcgtg ttcctgttcc cccccaaagcc caaggacacc 300
ctgatgatca gccgcacccc cgaggtgacc tgcgtggtcg tggatgtgag ccaggaagat 360
cccgaagtgc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag 420
cccagagaag agcagttcaa ctccacctac agagtgtgta gcgtgctgac cgtgctgcac 480
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaagg cctgccagc 540

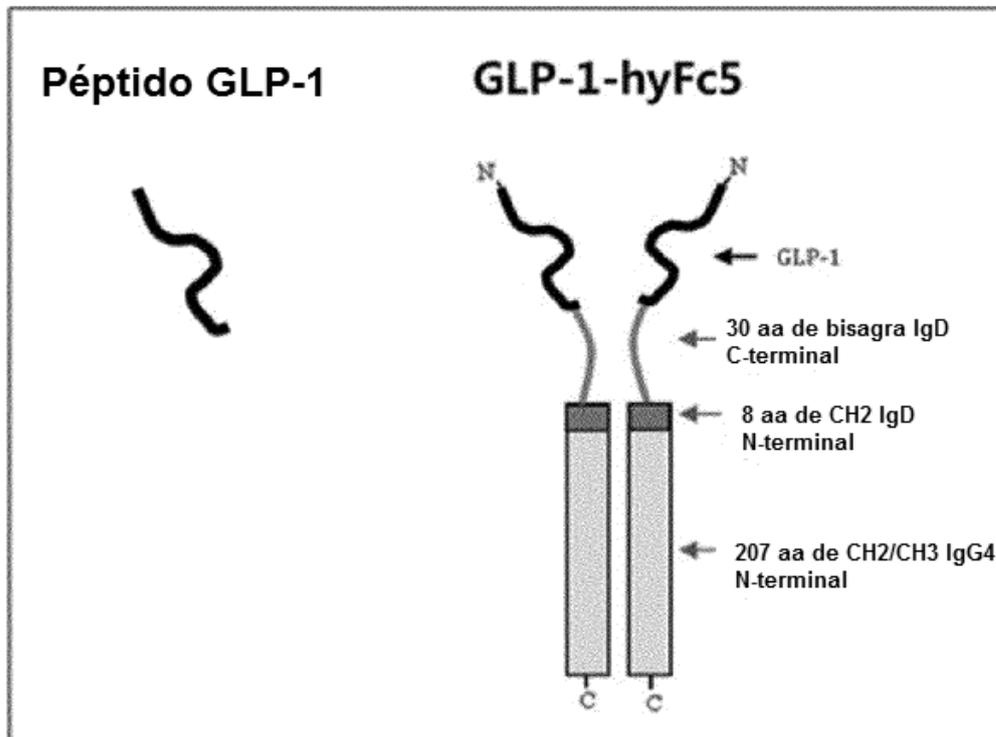
ES 2 757 812 T3

tccatcgaga agaccatcag caaagccaaa ggcagccca gagaaccca ggtgtacacc	600
ctgcctcca gccaggaaga gatgaccaag aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaaa	660
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggaaagca acggccagcc cgagaacaat	720
tacaagaaa cccctcccgt gctggatagc gatggcagct tctttctgta cagcagactg	780
accgtggaca agagcagatg gcaggaaggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgaa	840
gccctgcaca accactacac ccagaagagc ctgtccctga gcctgggcaa g	891

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión que comprende (a) péptido tipo glucagon (GLP) o un análogo del mismo, y (b) un polipéptido de Fc de inmunoglobulina,
 5 en el que el polipéptido de Fc de inmunoglobulina comprende (i) una región de bisagra de IgD aislada que consiste en una secuencia de aminoácidos de 35 a 49 residuos de aminoácidos consecutivos del extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 25; y (ii) un dominio CH2 y un dominio CH3 del polipéptido de Fc de inmunoglobulina.
2. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el GLP es GLP-1, y preferentemente en el que el GLP-1 consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 13.
3. El polipéptido de fusión de la reivindicación 2, en el que el análogo del GLP-1 comprende una modificación en un
 10 sitio, que se puede escindir mediante la enzima DPP-4, y consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2 a 12 y SEQ ID NOs: 14 a 24.
4. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el GLP es GLP-2, preferentemente en el que el GLP-2 consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44.
5. El polipéptido de fusión de la reivindicación 4, en el que un análogo del GLP-2 comprende una modificación en un
 15 sitio, que se puede escindir mediante la enzima DPP-4, y consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46.
6. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que la región de bisagra de IgD consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 26 a 28.
7. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de fusión exhibe una vida media aumentada
 20 en comparación con el polipéptido que no se fusiona con el polipéptido de Fc de inmunoglobulina.
8. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de fusión consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 30 a 32 y las SEQ ID NOs: 47 a 49.
9. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de la diabetes que comprende el polipéptido de fusión de la reivindicación 2 como un ingrediente activo.
- 25 10. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal, endoenteritis o diarrea causada por la quimioterapia anticáncer o síndrome del intestino corto, que comprende el polipéptido de fusión de la reivindicación 4 como un ingrediente activo.
11. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 12. El polinucleótido de la reivindicación 11, en el que el polinucleótido consiste en una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 41 a 43 y las SEQ ID NOs: 52 a 54.
13. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 11.
14. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 13.

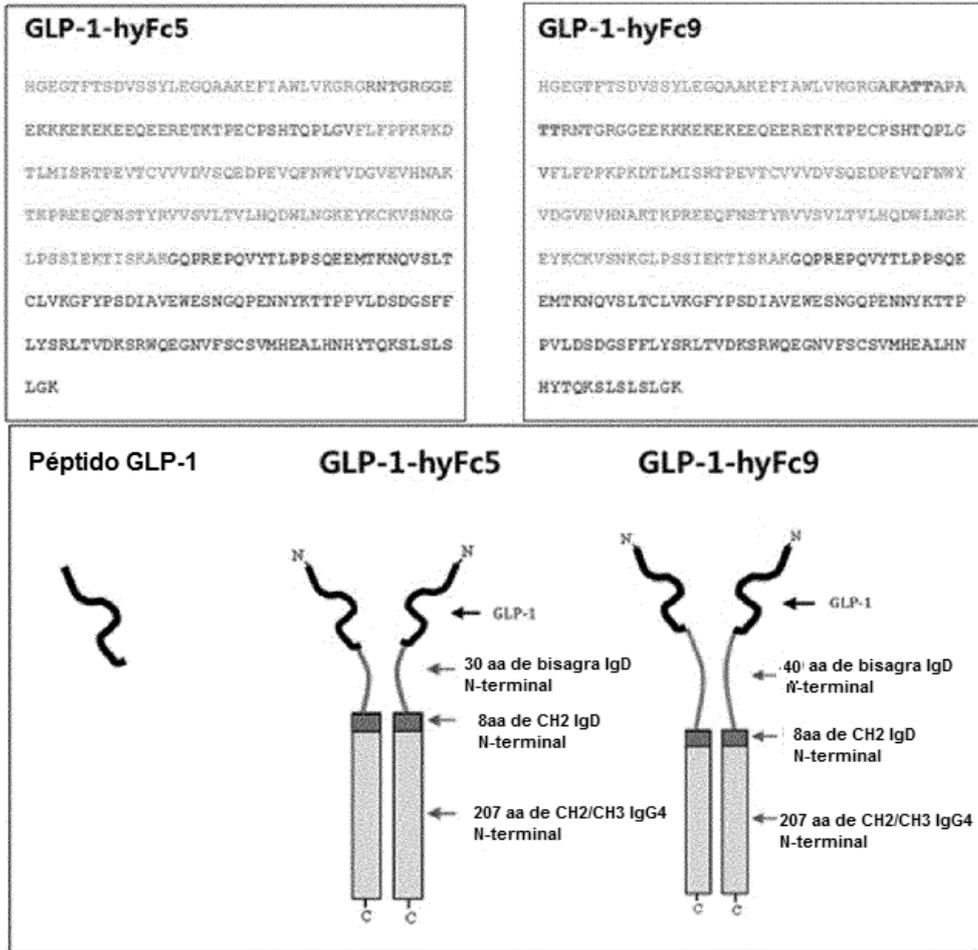
[Fig 1]



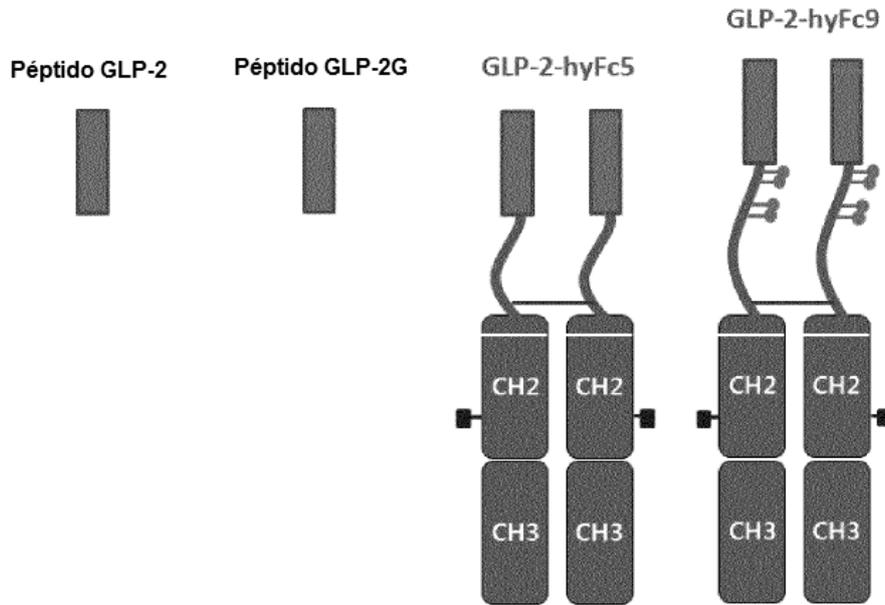
GLP-1-hyFc5

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRNTGRGGE
EKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
 LPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFF
 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLS
 LGK

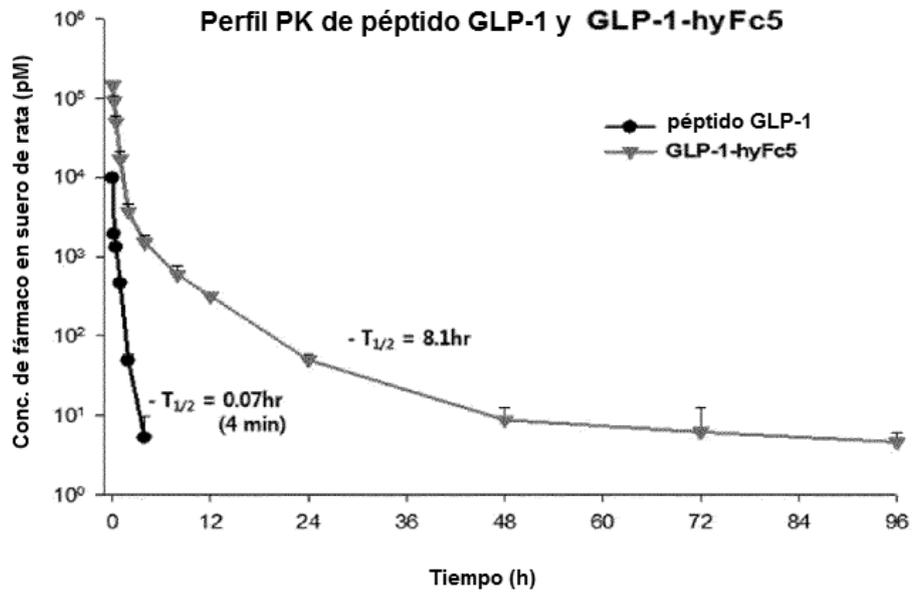
[FIG. 2]



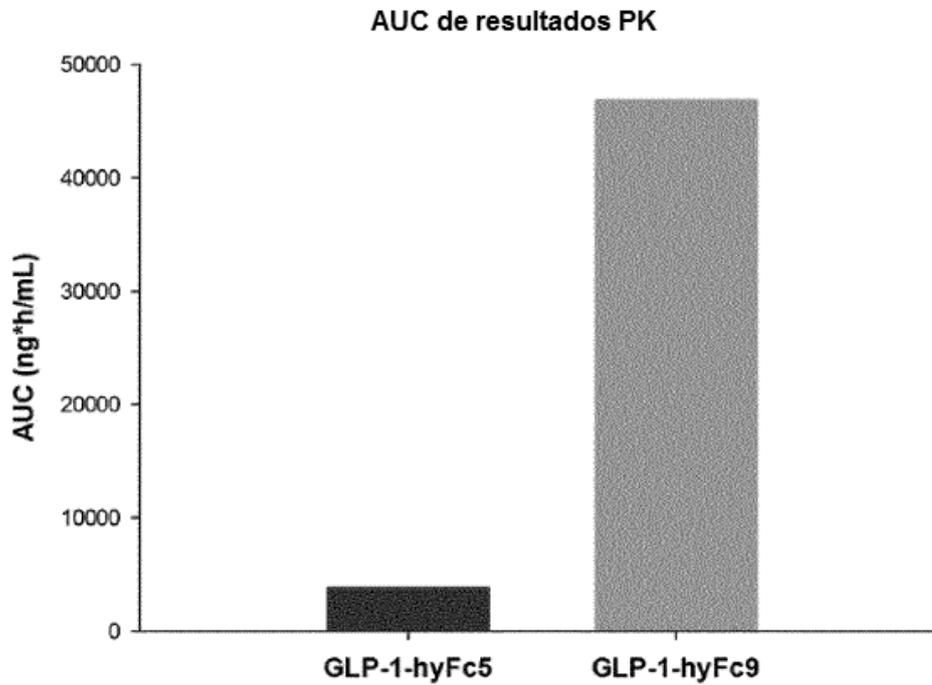
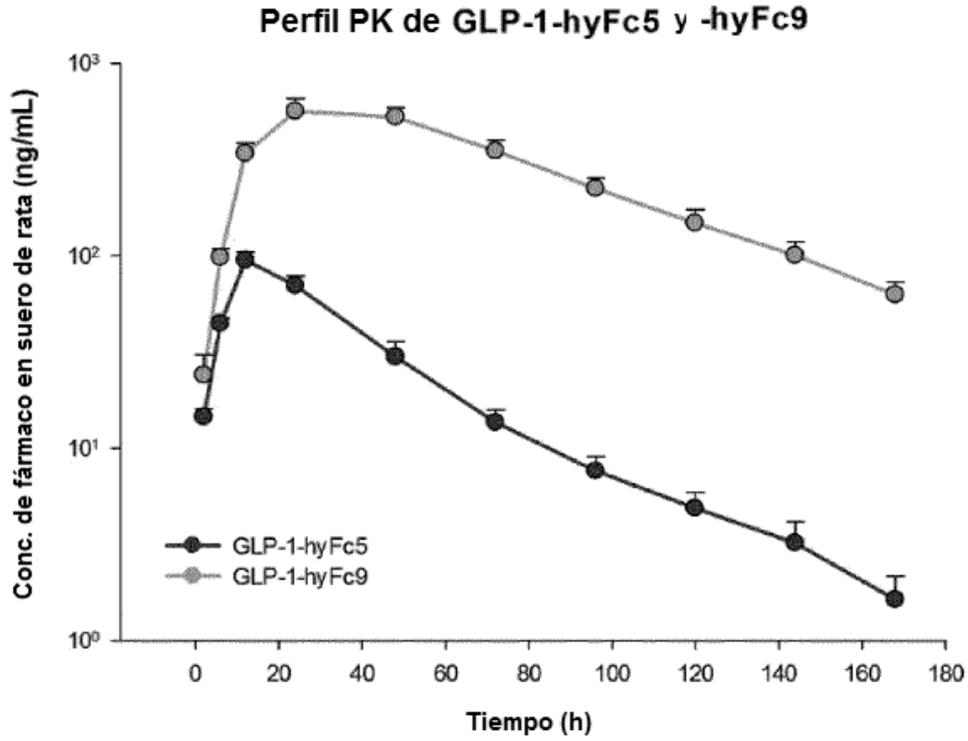
[FIG. 3]



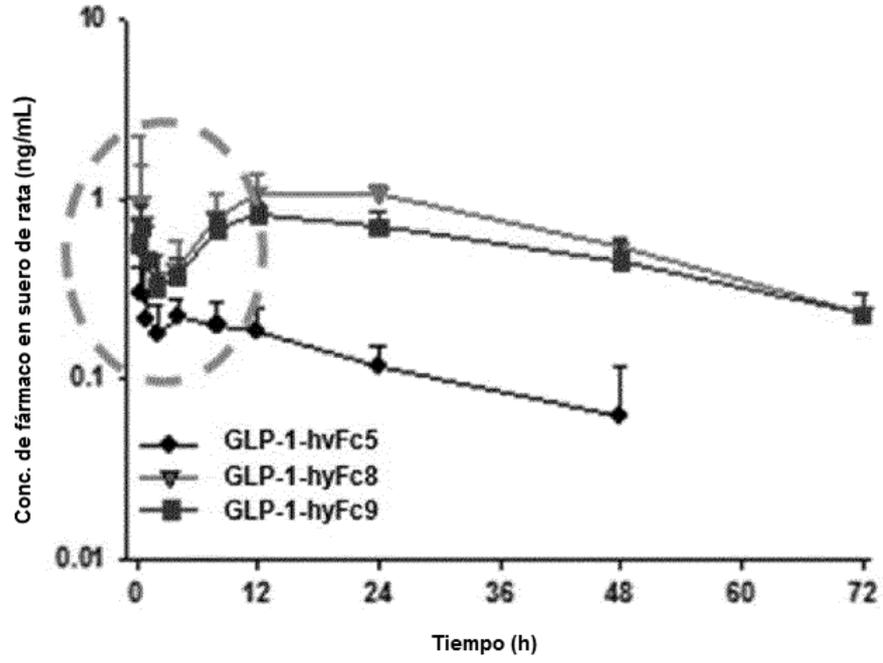
[FIG. 4]



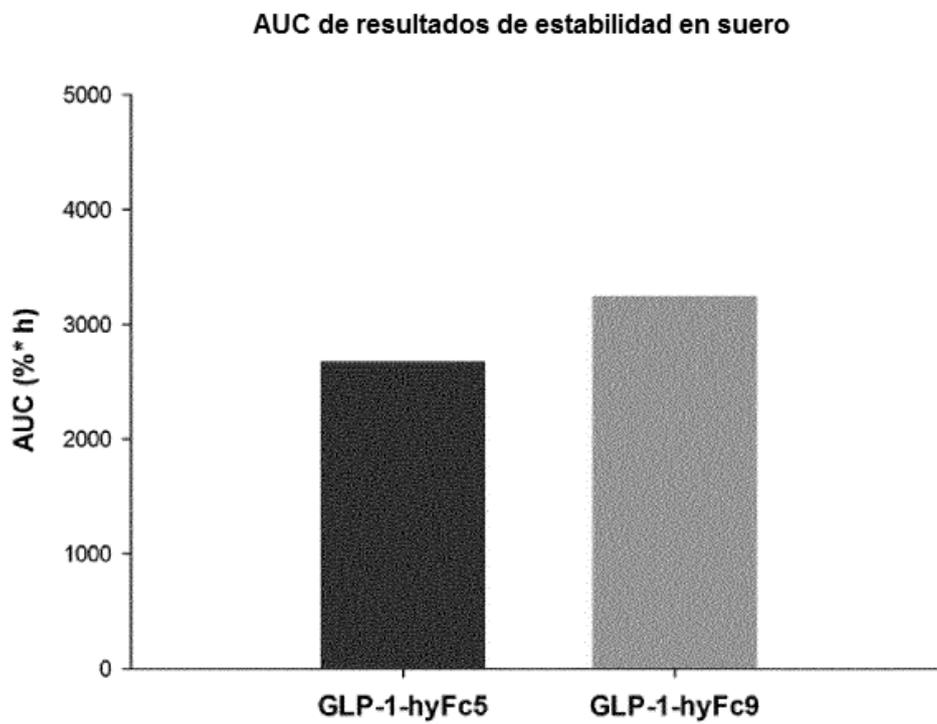
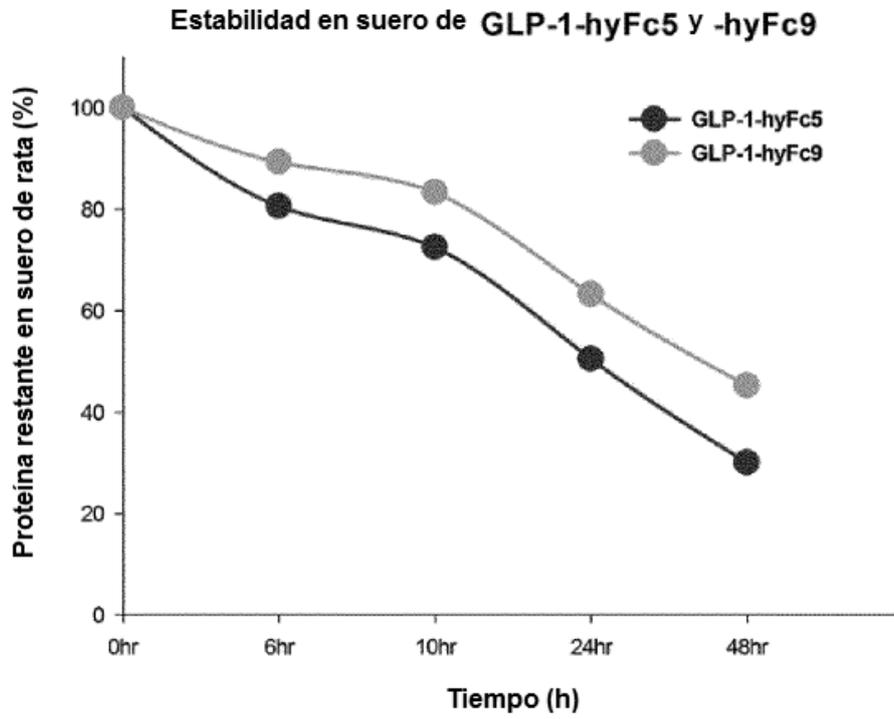
[FIG. 5]



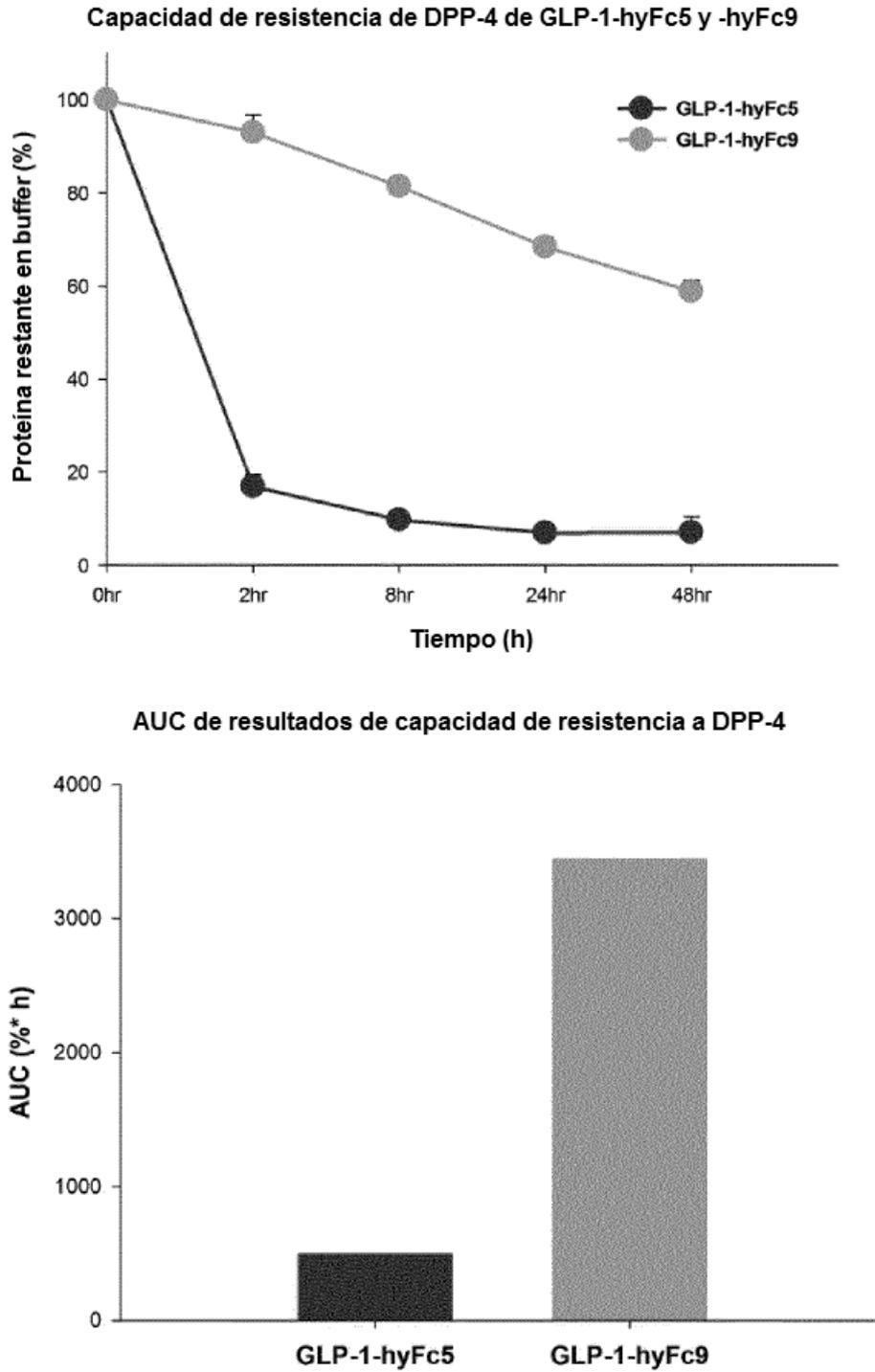
[FIG. 6]



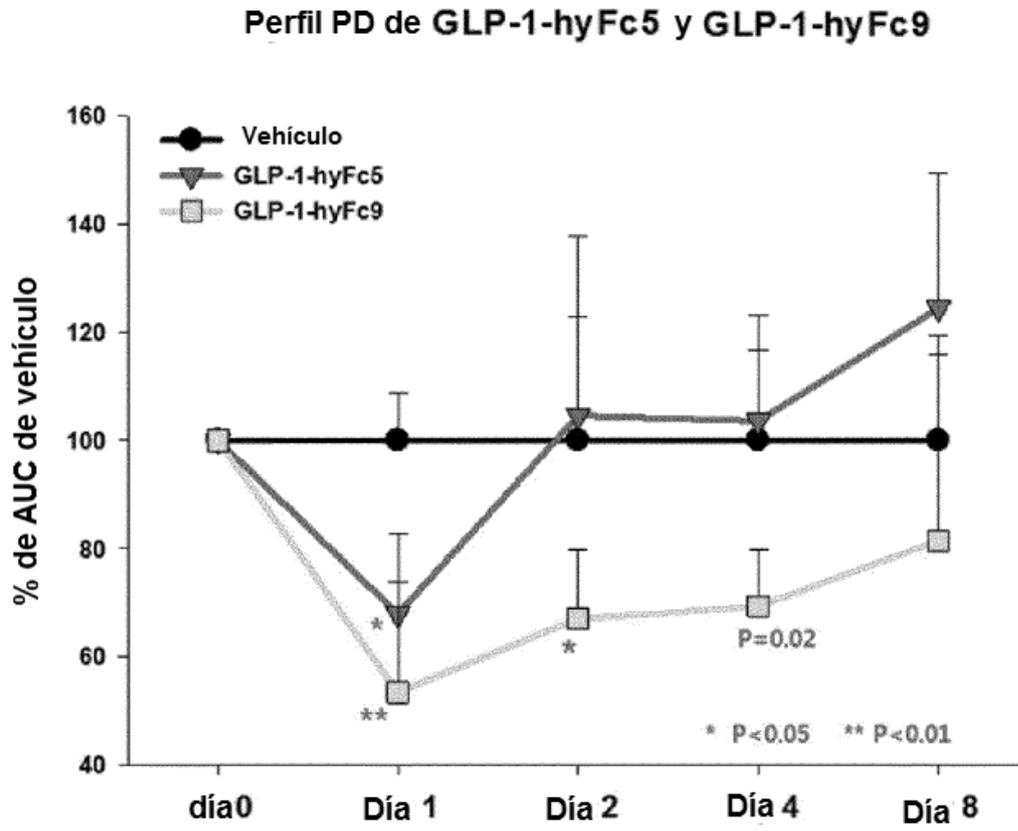
[FIG. 7]



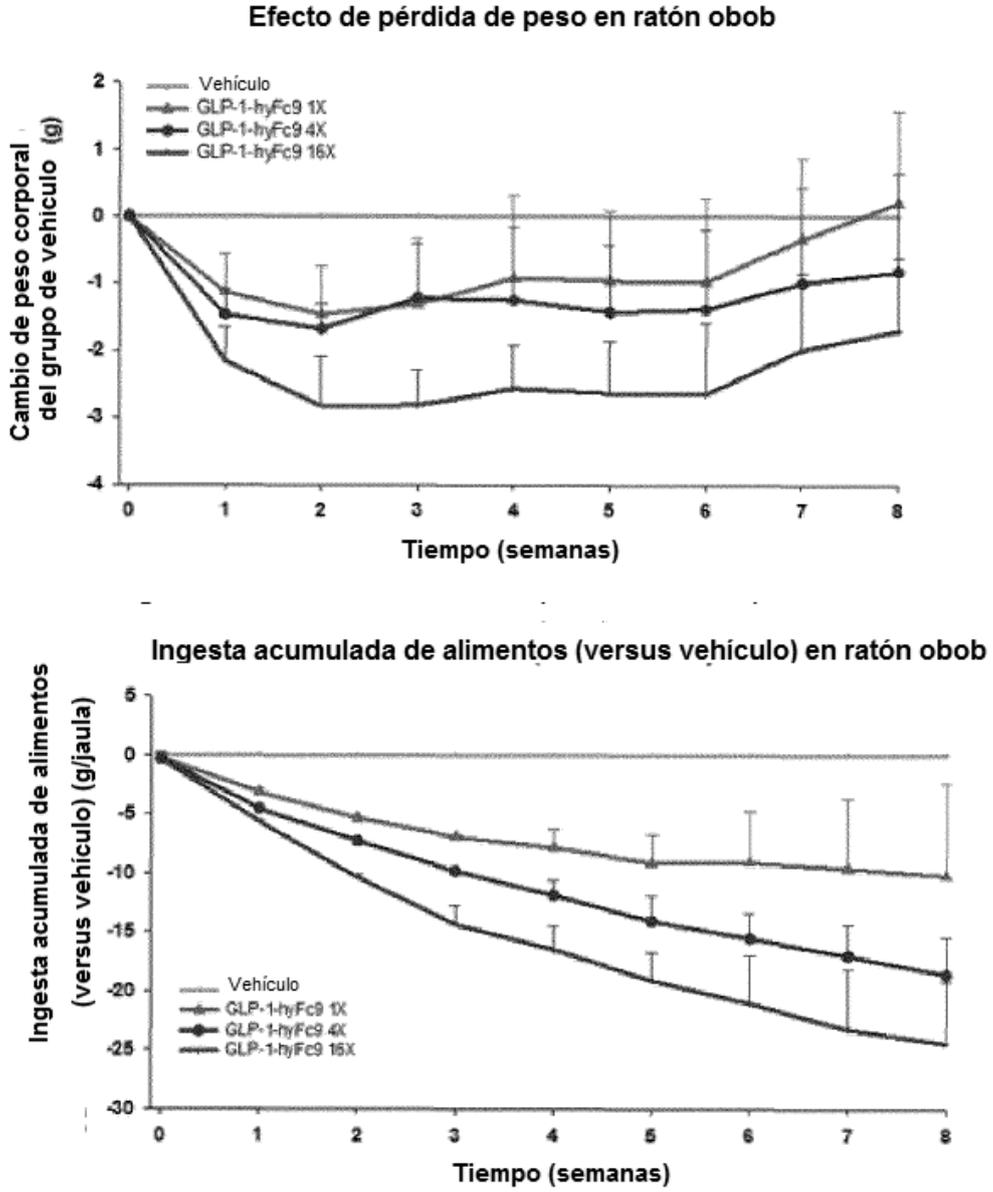
[FIG. 8]



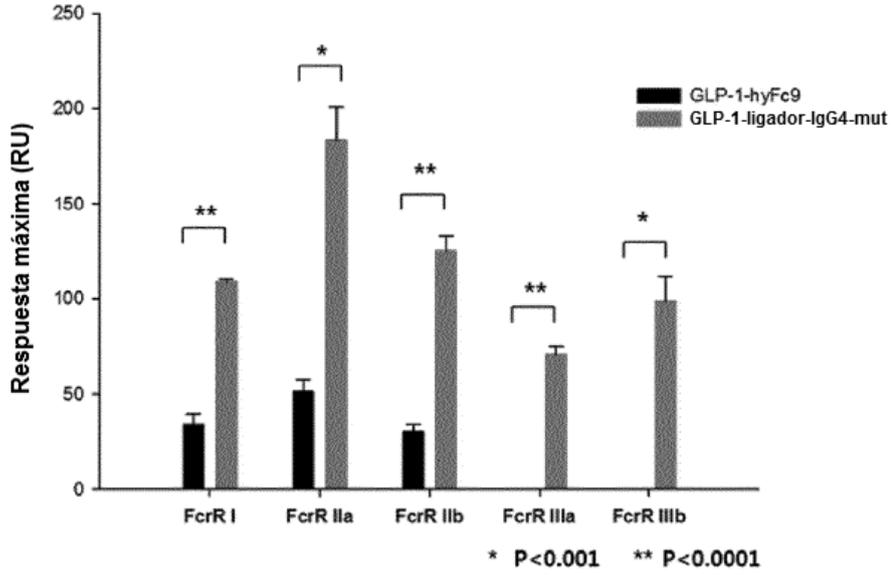
[FIG. 9]



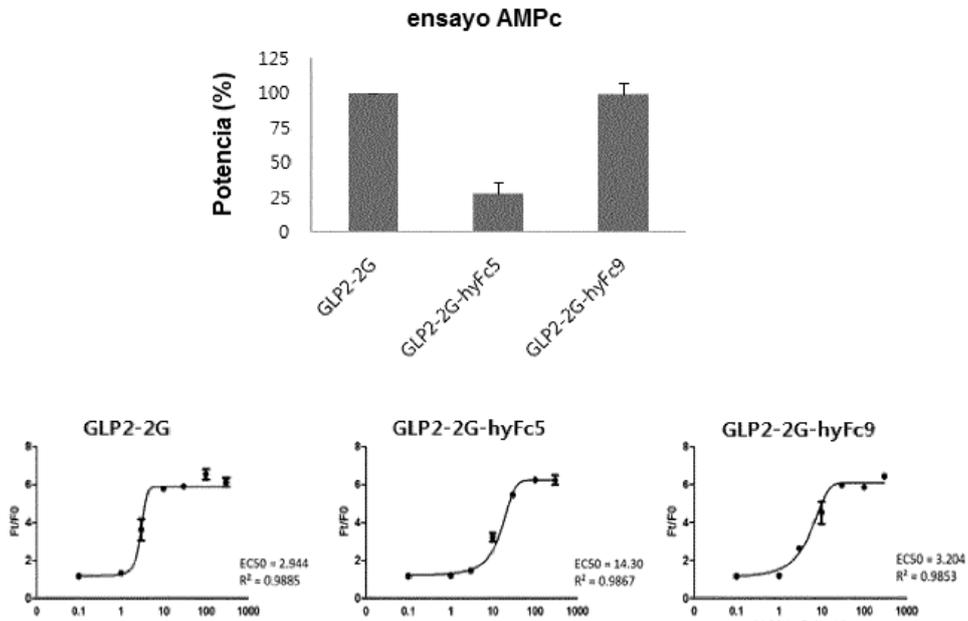
[FIG. 10]



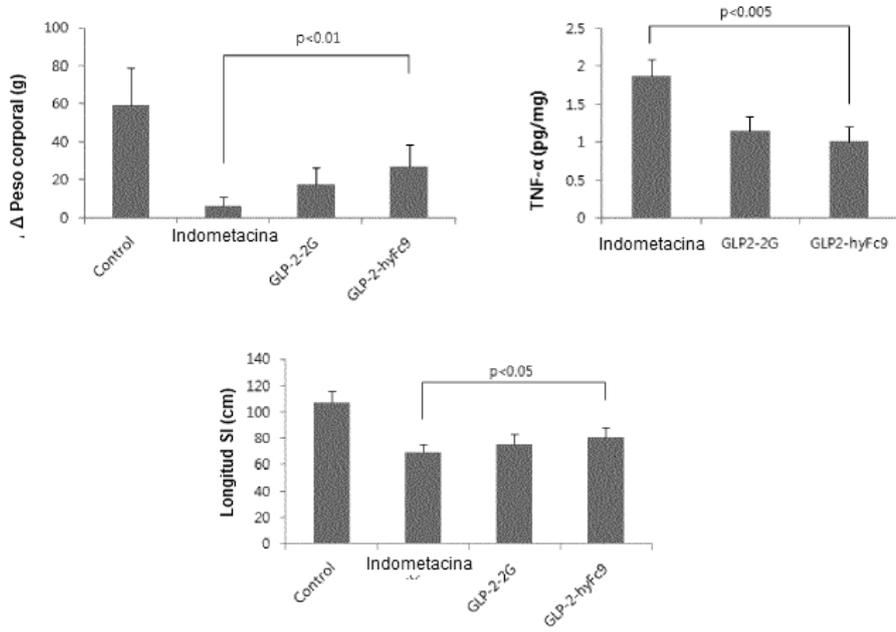
[FIG. 11]



[FIG. 12]

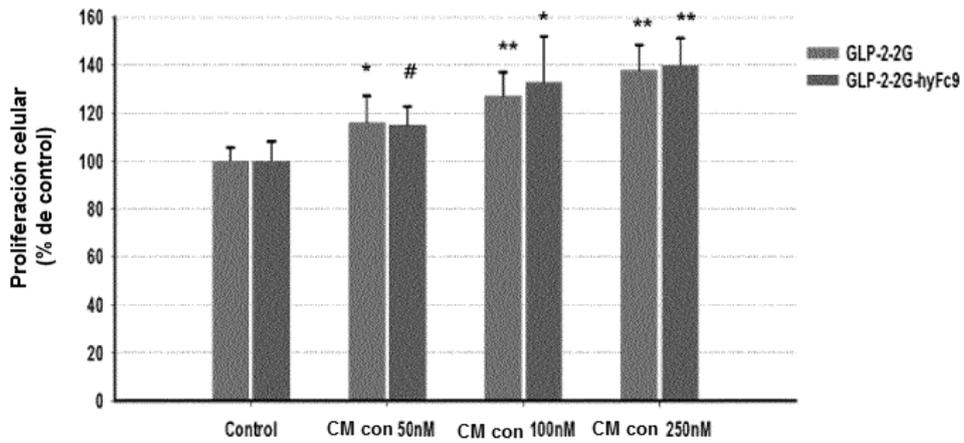


[FIG. 13]

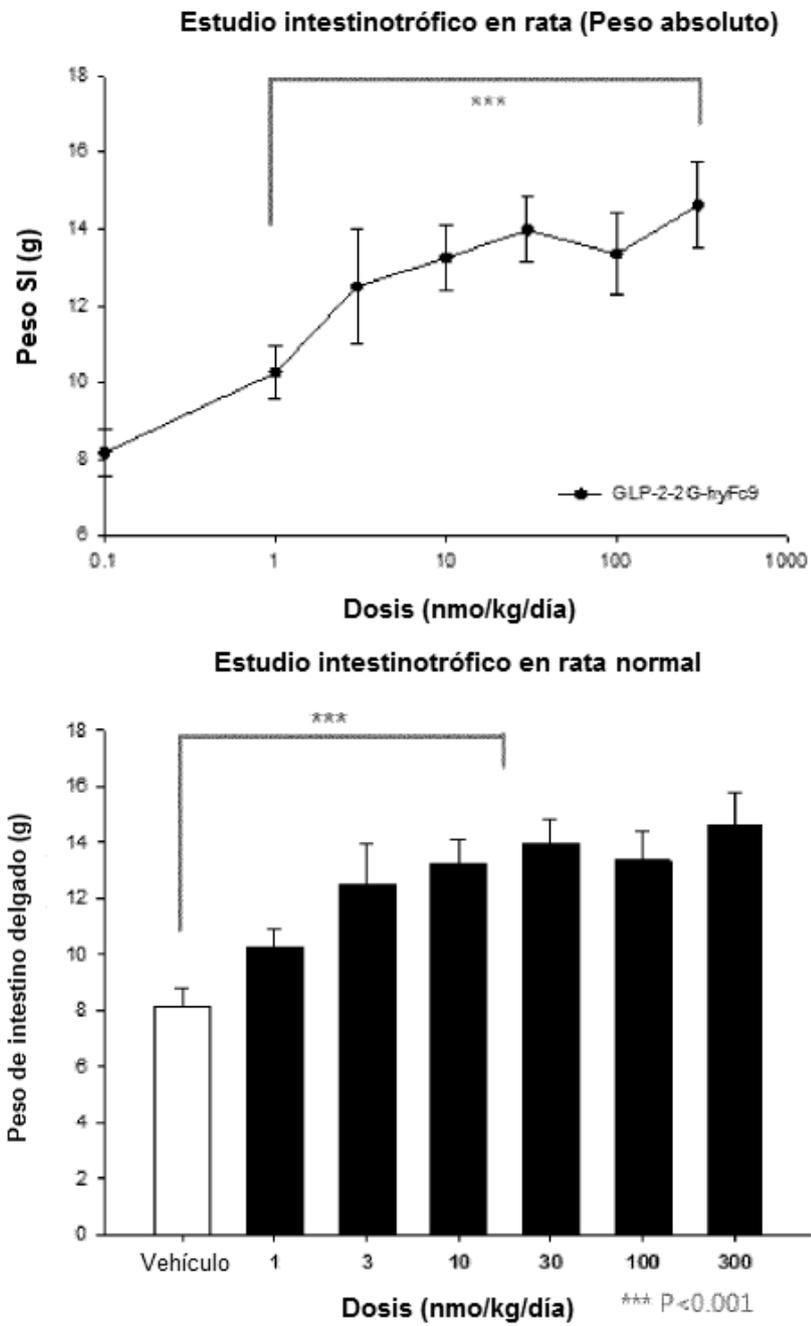


[FIG. 14]

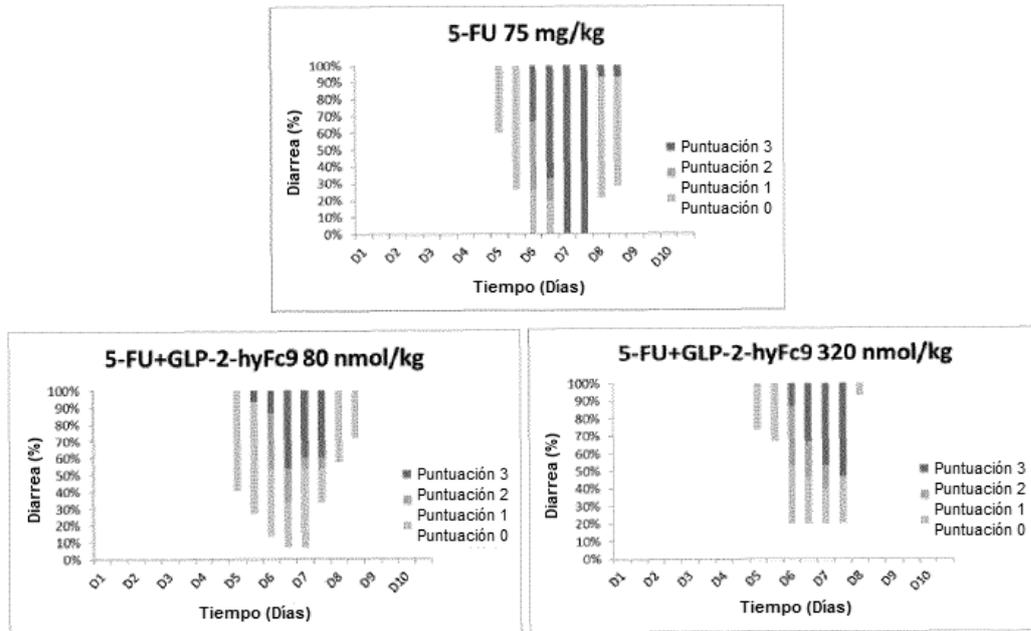
Proliferación de células CaCo-2 tratadas con medio acondicionado con fármaco de células CCD-18co (efecto indirecto)



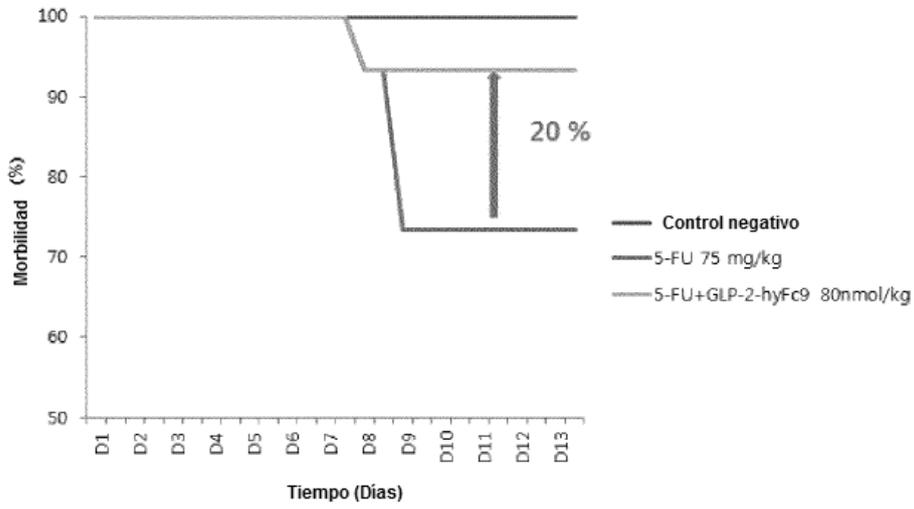
[FIG. 15]



[FIG. 16]



[FIG. 17]



- El grupo control 5-FU mostró **27 %** de morbilidad
- El grupo GLP-2-hyFc9 mostró **6.7 %** de morbilidad

En el día 11 (Punto final del control)	Supervivencia/Total (núm. de ratas)
Control negativo	15/15
5-FU 75 mg/kg	11/15
G4(5-FU+GX-G8 80 nmol/kg)	14/15