

451

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 03048706 03000005 Folios: 210
Fecha (ACB): 2004-09-02 09:14:44
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NUCI 309 COMPLETOS
Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Re: Expediente No. 03.048.706

Solicitud de patente titulada: "PROTEINAS DE FUSION DE GLP-1".

Solicitante: ELI-LILLY AND COMPANY.

MODIFICACIONES A LA SOLICITUD SEGÚN EL ARTICULO 34 DE LA DECISIÓN 486

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente:

1. Me permito realizar las siguientes modificaciones de la solicitud en trámite de acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486, de la siguiente manera:

a- Me permito **MODIFICAR** el título de la presente invención; el nuevo título debe leer: "Proteínas de fusión de GLP-1".

b- Me permito **MODIFICAR** el Capítulo Descriptivo de la siguiente manera:

i) En la página 15 –línea 5, en la posición 19 donde leía "Xaa", ahora lee "Tyr".

ii) En la página 15 –línea 7, en la posición 22 donde leía “Gly”, ahora lee “Xaa”.

iii) En la página 15 –línea 19, donde leía “19” ahora lee “22”.

El soporte para estas modificaciones se puede encontrar a lo largo de la solicitud y específicamente en la página 13 –línea 9; página 16 –línea 15; página 17 –línea 2; página 17 –línea 22; página 18 –línea 23; página 19 –líneas 7, 17 a 20; página 20 –líneas 9 a 18, página 20 –línea 19 a página 22 –línea 3. Consecuentemente, me permito adjuntar un Capítulo Descriptivo Modificado.

c- Me permito MODIFICAR el Capítulo Reivindicatorio de la siguiente manera:

i) En la página 110 –línea 7, donde leía “19” ahora lee “22”.

ii) En la página 122 –línea 9, donde leía “19” ahora lee “22”.

El soporte para estas modificaciones se puede encontrar a lo largo de la solicitud y específicamente en la página 13 –línea 9; página 16 –línea 15; página 17 –línea 2; página 17 –línea 22; página 18 –línea 23; página 19 –líneas 7, 17 a 20; página 20 –líneas 9 a 18, página 20 –línea 19 a página 22 –línea 3.

iii) En la página 111 –línea 2, en la posición 25 donde leía “Ala”, ahora lee “Xaa”.

iv) En la página 111 –línea 2, en la posición 26 donde leía “Xaa”, ahora lee “Lys”.

v) En la página 111 –línea 4, en la posición 30 donde leía “Ala”, ahora lee “Xaa”.

vi) En la página 111 –línea 4, en la posición 31 donde leía “Xaa”, ahora lee “Trp”.

v) En la página 123 –línea 5, en la posición 25 donde leía “Ala”, ahora lee “Xaa”.

vi) En la página 123 –línea 5, en la posición 26 donde leía “Xaa”, ahora lee “Lys”.

vii) En la página 123 –línea 7, en la posición 30 donde leía “Ala”, ahora lee “Xaa”.

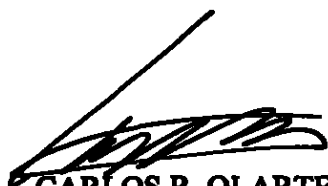
viii) En la página 123 –línea 7, en la posición 31 donde leía “Xaa”, ahora lee “Trp”.

Específicamente, el soporte para estas modificaciones se puede encontrar en la página 16 –líneas 15, 17; página 17 –líneas 5,7. Consecuentemente, me permito adjuntar un Capítulo Reivindicatorio Modificado.

2. Aclaro al Despacho que no se añadió materia nueva. Me permito adjuntar un recibo de pago para cubrir la tasa de modificación de la solicitud en trámite.

3. Aprovecho la presente oportunidad para poner en conocimiento del Despacho mi cambio de oficina, por lo que de ahora en adelante, recibiré notificaciones en la Calle 100 No. 8A-37 Torre A, Piso 10, World Trade Center, o en la secretaría de ese Despacho.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
cc. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexo: Capítulo Descriptivo Modificado.
 Capítulo Reivindicatorio Modificado.
 Recibo de Pago.

4544

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 59,723
FECHA : SEPTIEMBRE 1 DE 2004

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 83048785 E3633395 Folios: 218
Fecha (REC): 2004-09-02 09:14:44
Trámite : 811 PCT-PATENT 379 FREE HACT 329 COMPLETEN
Dependencia: 2826 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

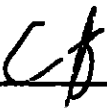
***** C O N S I G N A C

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
JHON BULLA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	276877719	01/09/2004	2,206,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEÑAS COMERCIALES	87,000.00
	TOTAL :	87,000.00

SON: OCHENTA Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____ 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE GLP-1

La presente invención se refiere a péptidos de tipo glucagón que incluyen análogos y derivados de los mismos condensados con proteínas que tienen el efecto de ampliar *in vivo* la semivida de los péptidos. Estas proteínas de fusión se pueden usar
5 para tratar diabetes mellitus no insulino dependiente así como una diversidad de otras afecciones.

El péptido tipo glucagón 1 (abreviadamente GLP - 1) es un péptido de 37 aminoácidos que lo secretan las células L en el intestino en respuesta a la ingestión de
10 alimentos. Se ha encontrado que estimula la secreción de insulina (acción insulínica), que ocasiona por lo tanto la captación de glucosa por las células y disminuye los niveles de glucosa en suero [véase, por ejemplo, Mojsov, S., (1992, *Int. J. Peptide Protein Research*, 40: 333 - 343)]. Sin embargo, el GLP - 1 es escasamente activo. Una posterior escisión endógena entre la 6ª y 7ª posición produce un péptido
15 GLP 1 (7-37) OH más potente biológicamente activo. Se conocen numerosos análogos y derivados de GLP - 1 y se indican en esta memoria descriptiva como "compuestos GLP - 1". Estos análogos de GLP - 1 incluyen las exendinas que son péptidos encontrados en el veneno del monstruo - GILA. Las exendinas tienen homología de secuencias con el GLP - 1 nativo y pueden unirse al receptor de GLP - 1 e iniciar la
20 cascada de señal de transducción responsable de las numerosas actividades que se han atribuido a GLP - 1 (7 - 37) OH.

Los compuestos GLP - 1 tienen una diversidad de actividades fisiológicamente significativas. Por ejemplo, se ha mostrado que los GLP - 1 estimula la liberación de insulina, reducen la secreción de glucagón, inhiben el vaciado gástrico y potencian la
25 utilización de la glucosa. [Nauck, M. A. y col (1993) *Diabetologia* 36: 741 - 744;

Gutniak, M., y col (1992) *New England J. of Med.* 326: 1316 – 1322; Nauck, M. A. y col., (1993) *J. Clin. Invest.* 91: 301 - 307].

El GLP – 1 representa la mayor promesa como un tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente [abreviadamente NIDDM]. Hay numerosos fármacos orales en el mercado para tratar la resistencia a la insulina asociada con la NIDDM. Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa los pacientes se deben cambiar a tratamientos que estimulen la liberación de insulina y eventualmente a tratamientos que impliquen inyecciones de insulina. Sin embargo, los fármacos actuales que estimulan la liberación de insulina pueden también ocasionar hipoglucemia como también puede ocasionar hipoglucemia la administración real de insulina. Sin embargo, la actividad de GLP – 1 se controla mediante los niveles de glucosa en sangre. Cuando los niveles caen a ciertos niveles umbral, el GLP – 1 no es activo. De este modo, no hay riesgo de hipoglucemia asociada con el tratamiento que implica GLP - 1.

Sin embargo, la utilidad de la terapia que implica péptidos GLP – 1 se ha limitado por sus rápidas eliminaciones y cortas semividas. Por ejemplo, GLP – (7 – 37) tiene una semivida en suero de 3 – 5 minutos solamente. La amida de GLP – 1 (7 – 36) tiene un tiempo de acción de aproximadamente 50 minutos cuando se administra subcutáneamente. Incluso los análogos y derivados que son resistentes a la escisión endógena con proteasa no tienen semividas suficientemente largas para evitar administraciones repetidas durante un período de 24 horas. Es inconveniente la eliminación rápida del agente terapéutico en casos en los que se desee mantener un alto nivel en sangre del agente durante un período prolongado de tiempo ya que entonces serán necesarias administraciones repetidas. Además, un compuesto de acción prolongada es particularmente importante para pacientes diabéticos cuyo régimen de tratamiento pasado ha implicado tomar sólo medicación oral. A menudo estos pacientes

tienen un tiempo extremadamente difícil de transición a un régimen que implique inyecciones múltiples de medicación.

La presente invención supera los problemas asociados con la administración de un compuesto que tiene una corta semivida en plasma. Los compuestos de la presente
5 invención comprenden compuestos de GLP - 1 condensados con otra proteína con una larga semivida de circulación tal como la porción Fc de una inmunoglobulina o albúmina.

En general, péptidos terapéuticos pequeños son difíciles de manipular porque incluso ligeros cambios en su estructura pueden afectar a la estabilidad y/o actividad
10 biológica. Esto ha sido especialmente cierto para los compuestos de GLP - 1 actualmente en desarrollo. Por ejemplo, GLP - 1 (7 - 37) OH tiene una tendencia a experimentar un cambio de conformación desde una estructura principalmente de hélice alfa a una estructura principalmente de hoja beta. Esta forma de hoja beta da como resultado un material agregado que se piensa que es inactivo. Por lo tanto, fue
15 sorprendente que se pudieran desarrollar proteínas de fusión de GLP - 1 biológicamente activas las semividas aumentadas. Fue especialmente inesperado dada la dificultad de trabajar con GLP - 1 (7 - 37) OH solo y el gran tamaño del coparticipe en la fusión pequeño péptido GLP - 1 adjunto.

20 Los compuestos de la presente invención incluyen proteínas de fusión heterólogas que comprenden un primer polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal condensados a un segundo polipéptido con extremo N terminal y un extremo C terminal en las que el primer polipéptido es un compuesto GLP - 1 y el segundo polipéptido se selecciona del grupo constituido por

25 a) albúmina humana;

b) análogos de albúmina humana; y

c) fragmentos de albúmina humana,

y en las que el extremo C terminal del primer polipéptido se condensa al extremo N terminal del segundo polipéptido.

5 Los compuestos de la presente también incluyen una proteína de fusión heteróloga que comprende un primer polipéptido con un extremo N terminal y extremo C terminal condensado con un segundo polipéptido con un extremo N terminal y extremo C terminal en la que el primer polipéptido es un compuesto GLP – 1 y el segundo polipéptido se selecciona de un grupo constituido por

10 (a) albúmina humana;

(b) análogos de albúmina humana; y

(c) fragmentos de albúmina humana,

y en la que el extremo C terminal del primer polipéptido se condensa con el extremo N terminal del segundo polipéptido mediante un engarce de péptidos. Se prefiere que el

15 engarce de péptidos se seleccione del grupo constituido por:

a) un péptido rico en glicina;

b) un péptido que tiene la secuencia $[Gly - Gly - Gly - Gly - Ser]_n$ en la que n es 1, 2, 3, 4, 5, ó 6; y

c) un péptido que tiene la secuencia $[Gly - Gly - Gly - Gly - Ser]_3$.

20 Los compuestos adicionales de la presente invención incluyen una proteína de fusión heteróloga que comprende un primer polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal condensado con un segundo polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal en el que el primer polipéptido es un compuesto GLP – 1 y el segundo polipéptido se selecciona del grupo constituido por

25 a) la porción Fc de una inmunoglobulina;

b) el análogo de la porción Fc de una inmunoglobulina; y
c) fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina, y estando el extremo C terminal del primer polipéptido condensado con el extremo N terminal del segundo polipéptido. El compuesto GLP - 1 se puede condensar con el segundo polipéptido mediante un engarce de péptidos. Es preferible que el engarce de péptidos se seleccione entre un grupo constituido por:

5

- a) un péptido rico en glicina;
b) un péptido que tiene la secuencia [Gly - Gly - Gly - Gly - Ser]_n en la que n es 1, 2, 3, 4, 5, ó 6; y
c) un péptido que tiene la secuencia [Gly - Gly - Gly - Gly - Ser]₃.

10

Generalmente se prefiere que el compuesto GLP - 1 que es parte de la proteína de fusión heteróloga no tenga más de 6 aminoácidos que sean diferentes del correspondiente aminoácido en GLP - 1 (7 - 37) OH, GLP - 1 (7 - 36) OH, o exendina - 4. Incluso se prefiere más que el compuesto GLP - 1 no tenga más de 5 aminoácidos diferentes del correspondiente aminoácido en GLP - 1 (7 - 37) OH, GLP - 1 (7 - 36) OH, o exendina - 4. Se prefiere más que el compuesto GLP - 1 no tenga más de 4, 3, ó 2 aminoácidos diferentes del correspondiente aminoácido en GLP - 1 (7 - 37) OH, GLP - 1 (7 - 36) OH, o exendina - 4. Preferiblemente, un compuesto de GLP - 1 que es parte de la proteína de fusión heteróloga tiene glicina o valina en la posición 8.

15

20

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican la proteína de fusión heteróloga descrita en esta memoria descriptiva, vectores que comprenden estos polinucleótidos y células huésped transfectadas o transformadas con los vectores descritos en esta memoria descriptiva. También se incluye un proceso para producir una proteína de fusión heteróloga que comprende las etapas de transcripción y traducción de

25

un polinucleótido descrito en esta memoria descriptiva en condiciones en las que la proteína de fusión heteróloga se expresa en cantidades detectables.

La presente invención también comprende un procedimiento para normalizar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero que lo requiera que comprende la
5 administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión heteróloga descrita en esta memoria descriptiva.

Además la invención también se ilustra con referencia a los siguientes dibujos:

Figura 1: secuencia de aminoácidos de IgG₁ Fc que comprende los dominios de
10 la región flexible, CH₂ y CH₃.

Figura 2: secuencia de aminoácidos de albúmina de suero humano.

Figura 3: A. Gel de SDS – PAGE e inmunotransferencia del mismo gel que ilustra el peso molecular de proteínas de fusión de IgG₁ - Fc y GLP – 1 – Fc (franja 1, patrones PM; franja 2, Fc purificada; franja 3, medio transfectado de Mock; franja 4, Val⁸ – GLP – 1 – Fc; franja 5, Exendina – 4-Fc) B. Gel de SDS - PAGE e
15 inmunotransferencia del mismo gel que ilustran el peso molecular de HSA humana y proteínas de fusión de GLP – 1 – HSA (franja 1, patrones PM; franja 2, HSA purificada; franja 3, medio transfectado de Mock; franja 4, Val⁸ – GLP – 1 – HSA; franja 5, val⁸ – GLP – 1 – [Gly – Gly – Gly – Gly – Ser]₃ – HSA; Franja 6, exendina - 4 – HSA; Franja
20 7, exendina – 4 – [Gly – Gly – Gly – Gly – Ser]₃ – HSA).

Figura 4: gel de SDS – PAGE de Fc purificado, albúmina y proteínas de fusión de GLP – 1 (franja 1, patrones de PM; franja 2, Fc purificado; franja 3, Val⁸ – GLP – 1 – Fc; franja 4, exendina – 4 – Fc; franja 5, patrón PM; franja 6, Val⁸ – GLP – 1 – HSA; franja 7, exendina – 4 – HSA; franja 8, exendina – 4 - [Gly – Gly – Gly – Gly – Ser]₃ –
25 HSA).

Figura 5: vector de expresión de clonaje que contiene las regiones Fc ilustradas en la figura 1.

Figura 6: vector de expresión de clonaje que contiene la secuencia de albúmina ilustrada en la figura 2.

5 Figura 7: vector de expresión de clonaje que contiene DNA que codifica un engarce de 15 aminoácidos condensado en fase y la posición 5' de la secuencia de albúmina ilustrada en la figura 2.

Figura 8: actividad de respuesta a la dosis *in vitro* de las proteínas de fusión de GLP – 1.

10 Figura 9: farmacocinética de las proteínas de fusión GLP-1-Fc y GLP-1-HSA.

Figura 10: respuesta glucodinámica a exendina – Fc en dos perros en ayunas normales.

Figura 11: respuesta insulínica a exendina – Fc en dos perros en ayunas normales.

15 Figura 12. secuencia de DNA que codifica una región de IgG1 Fc humana.

Figura 13: secuencia de DNA que codifica una proteína de albúmina humana.

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención comprenden un compuesto GLP – 1 condensado a albúmina humana, un análogo de albúmina humana, un fragmento de albúmina humana, la porción Fc de una inmunoglobulina, un análogo de la porción Fc de una inmunoglobulina, o un fragmento de la porción Fc de una inmunoglobulina. El extremo C terminal del compuesto GLP – 1 se puede condensar directamente, o se puede condensar por medio de un engarce de péptidos, con el extremo N terminal de una proteína albúmina Fc. Estas proteínas de fusión heterólogas son biológicamente activas y tienen una semivida aumentada comparada

20

25

con el GPL – 1 nativo.

Se prefiere que los compuestos GLP – 1 que forman parte de la proteína de fusión heteróloga comprendan polipéptidos que tienen entre aproximadamente veinticinco y aproximadamente treinta y nueve aminoácidos de origen natural o de origen no natural que tienen suficiente homología con el GLP – 1 (7 – 37) OH nativo de modo que muestran actividad insulintrópica mediante la unión al receptor de GLP – 1 en las células β del páncreas. Típicamente un compuesto GLP – 1 comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de GLP – 1 (7 – 37) OH, un análogo de GLP – 1 (7 – 37) OH, un fragmento de GLP – 1 (7 – 37) OH o un fragmento de un análogo de GLP – 1 (7 – 37) OH. El GLP – 1 (7 – 37) OH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1:

	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
15	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe
	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly		
	(SEC ID N° 1)										

Es costumbre en la técnica que al extremo amino terminal de GLP – 1 (7 – 37) OH se le asigne el residuo número 7 y al extremo carboxilo terminal el número 37. Los otros aminoácidos en el polipéptido se numeran consecutivamente como se muestra en la SEC ID N° 1. Por ejemplo, la posición 12 es fenilalanina y la posición 22 es glicina.

Los compuestos GLP – 1 también comprenden “fragmentos de GLP – 1”. Un fragmento de GLP – 1 es un polipéptido obtenido después del truncamiento de uno o

más aminoácidos del extremo N terminal y/o extremo C terminal de GLP – 1 (7 – 37) OH o un análogo o un derivado del mismo. La nomenclatura utilizada para describir GLP – 1 (7 – 37) OH es también aplicable a los fragmentos de GLP – 1. Por ejemplo, GLP – 1 (9 – 36) OH designa un fragmento obtenido mediante el truncamiento de dos aminoácidos del extremo N terminal y un aminoácido del extremo C terminal. Los aminoácidos en el fragmento se designan mediante el mismo número que el correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH. Por ejemplo, el ácido glutámico del extremo N terminal en GLP – 1 (9 – 36) OH está en la posición 9; la posición 12 está ocupada por fenilalanina; y la posición 22 está ocupada por glicina, como en GLP – 1 (7 – 37) OH. Para GLP – 1 (7 – 37) OH, la glicina de la posición 37 de GLP – 1 (7 – 37) OH está suprimida.

Los compuestos GLP – 1 también incluyen polipéptidos en los que se han añadido uno o más aminoácidos al extremo N terminal y/o extremo C terminal de GLP – 1 (7 – 37) OH, o fragmentos o análogos de los mismos. Es preferible que los compuestos GLP – 1 de este tipo tengan hasta aproximadamente treinta y nueve aminoácidos. Los aminoácidos en el compuesto GLP – 1 “extendido” se designan mediante el mismo número que el correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH. Por ejemplo, el aminoácido del extremo N terminal de compuesto GLP – 1 obtenido mediante la adición de dos aminoácidos al terminal N de GLP – 1 (7 – 37) OH está en la posición 5; y el aminoácido del extremo C terminal del compuesto GLP – 1 obtenido mediante la adición de un aminoácido al extremo C terminal de GLP – 1 (7 – 37) OH está en la posición 38. De este modo, la posición 12 está ocupada por fenilalanina y la posición 22 está ocupada por glicina en ambos de estos compuestos de GLP – 1 “extendidos” como en GLP – 1 (7 – 37) OH. Los aminoácidos 1 – 6 de un compuesto de GLP – 1 extendido son preferiblemente los mismos o una sustitución conservadora del

mismo aminoácido en la posición correspondiente de GLP - 1 (1 - 37) OH. Los aminoácidos 38 - 45 de un compuesto de GLP - 1 extendido son preferiblemente los mismos o una sustitución conservadora del aminoácido en la posición correspondiente de glucagón o exendina - 4.

5 Los compuestos de GLP - 1 de la presente invención comprenden "análogos de GLP - 1". Un análogo de GLP - 1 tiene una homología suficiente con GLP - 1 (7 - 37) OH o un fragmento de GLP - 1 (7 - 37) OH de forma que el análogo tiene actividad insulínica. Preferiblemente, un análogo de GLP - 1 tiene la secuencia de aminoácidos de GLP - 1 (7 - 37) OH o un fragmento de la misma, modificada de
10 manera que de uno, dos, tres, cuatro, o cinco aminoácidos difieren del aminoácido en la posición correspondiente de GLP - 1 (7 - 37) OH o un fragmento de GLP - 1 (7 - 37) OH. En la nomenclatura usada en esta memoria descriptiva para designar los compuestos GLP - 1, el aminoácido sustituyente y su posición se indican antes que la estructura de partida. Por ejemplo, Glu²² - GLP - 1 (7 - 37) OH designa un compuesto
15 de GLP - 1 en el que la glicina que normalmente se encuentra en la posición 22 de GLP - 1 (7 - 37) OH se ha sustituido con ácido glutámico; Val⁸ - Glu²² - GLP - 1 (7 - 37) OH designa un compuesto de GLP - 1 en el que la alanina que normalmente se encuentra en la posición 8 y la glicina que normalmente se encuentra en la posición 22 de GLP - 1 (7 - 37) OH se han sustituido con valina y ácido glutámico respectivamente.

20 Los compuestos GLP - 1 de la presente invención también incluyen "derivados de GLP - 1". Un derivado de GLP - 1 se define como una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de GLP - 1 o de un análogo de GLP - 1, pero que tiene adicionalmente una modificación química de uno o más de sus grupos laterales de aminoácidos, átomos de carbono α , grupo amino terminal o grupo ácido carboxílico
25 terminal. Una modificación química incluye, pero no está limitada a, la adición de

restos químicos, creación de nuevos enlaces y eliminación de restos químicos. Las modificaciones en los grupos laterales de aminoácidos incluyen, sin limitación, acilación de los grupos amino ϵ de lisina, N-alquilación de arginina, histidina, o lisina, alquilación de grupos ácidos carboxílicos glutámico o aspártico y desamidación de glutamina o asparagina. Las modificaciones del grupo amino terminal incluyen, sin limitación, las modificaciones de desamino, N-alquilo inferior, N-di-alquilo inferior, y N-acilo. Las modificaciones del grupo carboxi terminal incluyen, sin limitación, la amida, amida de alquilo inferior, dialquilamida y modificaciones de ester de alquilo inferior. Alquilo inferior es alquilo ($C_1 - C_4$). Además, uno o más grupos laterales, o grupos terminales, se pueden proteger mediante grupos protectores conocidos por los químicos de proteínas expertos habituales. El carbono α de un aminoácido puede ser mono- o dimetilado.

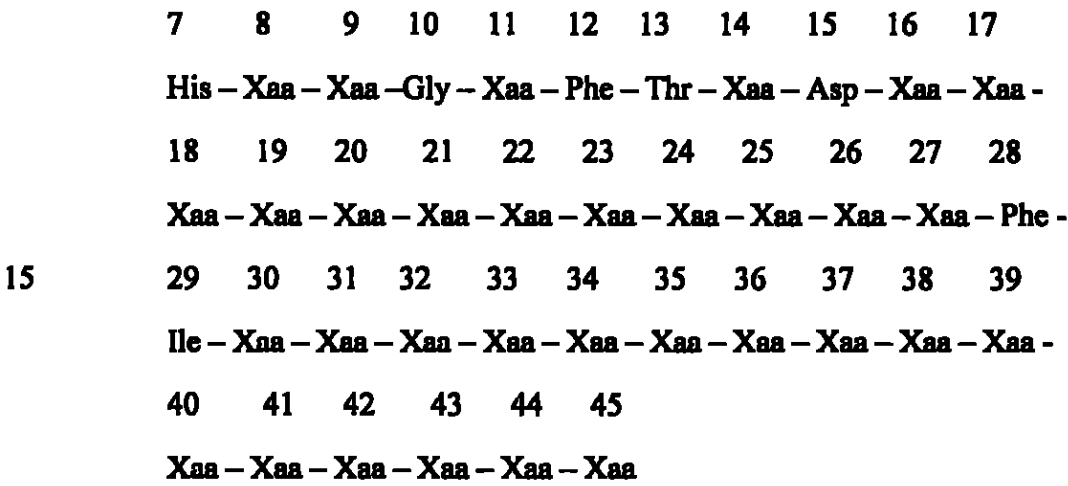
Cualquier compuesto GLP-1 puede ser parte de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención mientras que el compuesto GLP-1 sí mismo sea capaz de unirse e inducir señalización mediante el receptor de GLP-1. La unión al receptor de GLP-1 y la transducción de la señal se puede valorar usando ensayos *in vitro* tales como los descritos en el documento EP 619.322 y en la patente de Estados Unidos 5.120.712 respectivamente.

Se conocen en la técnica numerosos fragmentos análogos y derivados de GLP-1 activos y cualquiera de estos análogos y derivados también pueden ser parte de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención. Se proporcionan en esta memoria descriptiva algunos ejemplos de análogos de GLP-1 nuevos así como análogos y derivados de GLP-1 conocidos en la técnica.

Algunos análogos de GLP-1 y fragmentos de GLP-1 conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, GLP-1(7-34) y GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), Gln⁹-

GLP – 1(7 – 37), D - Gln⁹ - GLP – 1(7 – 37), Thr¹⁶ – Lys¹⁸ – GLP – 1 (7 – 37) y Lys¹⁸ – GLP – 1 (7 – 37). Los análogos de GLP – 1 tales como GLP – 1 (7 – 34) y GLP – 1 (7 – 35) se describen en la patente de Estados Unidos 5.118.666. Se conocen también las formas biológicamente elaboradas de GLP – 1 que tienen propiedades insulínótropas, 5 tales como GLP – 1 (7 – 36). Otros compuestos conocidos de GLP – 1 biológicamente activos se describen en la patente de Estados Unidos N° 5.997.071 de Hoffmann y col., la patente de Estados Unidos N° 5.545.618 de Buckley y col., y Adelhorst, y col., *J. Biol. Chem.* 269: 6275 (1994).

Un grupo preferido de análogos de GLP – 1 está compuesto de análogos de GLP 10 – 1 de fórmula I (SEC ID N° 2)



Fórmula (SEC ID N° 2)

20 en la que:

- Xaa en la posición 8 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 9 es Glu, Asp, o Lys;
- Xaa en la posición 11 es Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 14 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- 25 Xaa en la posición 16 es Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp o

Lys;

Xaa en la posición 17 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 18 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr o Lys;

5 Xaa en la posición 19 es Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, o Lys;

Xaa en la posición 20 es Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr o Lys;

Xaa en la posición 21 es Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 22 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys

10 Xaa en la posición 23 es Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 24 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 25 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 26 es Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, o His;

Xaa en la posición 27 es Leu, Glu, Asp o Lys;

15 Xaa en la posición 30 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 31 es Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 32 es Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 33 es Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 34 es Asn, Lys, Arg, Glu, Asp o His;

20 Xaa en la posición 35 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 36 es Gly, Arg, Lys, Glu, Asp o His;

Xaa en la posición 37 es Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys o

se ha suprimido;

Xaa en la posición 38 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp o His o se ha suprimido;

25 Xaa en la posición 39 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp o His, o se ha suprimido;

Xaa en la posición 40 es Gly, Asp, Glu o Lys o se ha suprimido;

Xaa en la posición 41 es Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;

Xaa en la posición 42 es Ser, Pro, Lys, Glu o Asp, o se ha suprimido;

Xaa en la posición 43 es Ser, Pro, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;

5 Xaa en la posición 44 es Gly, Pro, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;

y

Xaa en la posición 45 es Ala, Ser, Val, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;

con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 37, 38, 39, 40, 41,
42, 43 ó 44 se ha suprimido, entonces cada aminoácido cadema abajo de ese
10 aminoácido está también suprimido.

Se prefiere que el compuesto GLP - 1 de fórmula I contenga menos de seis
aminoácidos diferentes del aminoácido correspondiente en GLP - 1 (7 - 37) OH o
exendina - 4. Se prefiere más que menos de cinco aminoácidos sean diferentes del
correspondiente aminoácido en GLP - 1 (7 - 37) OH o exendina - 4. Se prefiere incluso
15 más que menos de cuatro aminoácidos sean diferentes del correspondiente aminoácido
en GLP - 1 (7 - 37) OH o exendina - 4.

Los compuestos GLP - 1 de la presente invención incluyen derivados de
fórmula I tales como ésteres de C₁₋₆, o amida, o alquil C₁₋₆ amida, o dialquil C₁₋₆
amida de los mismos. El documento WO 99/43706 describe derivados de compuestos
20 GLP - 1 de fórmula I y se incorpora en esta memoria descriptiva como referencia en su
totalidad. Los compuestos de fórmula I derivatizados como se describe en el documento
WO 99/43706 y no derivatizados se incluyen en la presente invención.

Otro grupo preferido de los compuestos GLP - 1 está compuesto de análogos de
25 GLP - 1 de fórmula II (SEC ID N° 3):

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa – Xaa – Xaa – Gly – Xaa – Xaa – Thr – Ser – Asp – Xaa – Ser –
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
5 Xaa – Tyr – Leu – Glu – Xaa – Xaa – Xaa – Ala – Xaa – Xaa – Phe –
29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile – Xaa – Xaa – Leu – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – R

Fórmula II (SEC ID N° 3)

en la que:

10 Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D – histidina, desaminohistidina, 2 -
aminohistidina, β – hidroxihistidina, homohistidina, α – fluorometilhistidina o α –
metilhistidina;

Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa en la posición 9 es: Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu o His;

15 Xaa en la posición 11 es: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys o His;

Xaa en la posición 12 es: His, Trp, Phe o Tyr;

Xaa en la posición 16 es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr, Glu o Ala;

Xaa en la posición 18 es: His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala o Lys;

Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;

20 Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu, Gln o Arg;

Xaa en la posición 24 es: Glu, Arg, Ala o Lys;

Xaa en la posición 26 es: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu o His;

Xaa en la posición 27 es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;

Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;

25 Xaa en la posición 31 es: Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp o Lys;

26
470

Xaa en la posición 33 es: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly o Glu;

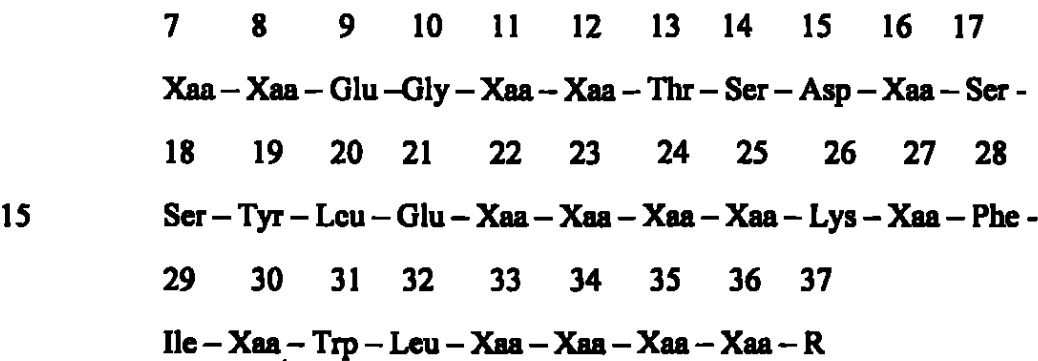
Xaa en la posición 34 es: Glu, Lys o Asp;

Xaa en la posición 35 es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o Glu;

5 Xaa en la posición 36 es: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu o His;

R en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly – Pro o se ha suprimido.

Otro grupo preferido de los compuestos de GLP – 1 está compuesto de análogos
10 de GLP – 1 de fórmula III (SEC ID N° 4):



Fórmula III (SEC ID N° 4)

en la que:

20 Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β – hidroxihistidina, homohistidina, α – fluorometilhistidina o α – metilhistidina;

Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa en la posición 11 es: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys o His;

25 Xaa en la posición 12 es: His, Trp, Phe o Tyr;

21
471

- Xaa en la posición 16 es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;
Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;
Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu o Gln;
Xaa en la posición 24 es: Glu, His, Ala o Lys;
5 Xaa en la posición 25 es: Asp, Lys; Glu o His;
Xaa en la posición 27 es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;
Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;
Xaa en la posición 33 es: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly o Glu;
Xaa en la posición 34 es: Glu, Lys o Asp;
10 Xaa en la posición 35 es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o
Glu;
Xaa en la posición 36 es: Asp, Glu o His;
R en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly,
Gly – Pro o se ha suprimido.

15

Otro grupo preferido de los compuestos de GLP – 1 está compuesto de análogos
de GLP – 1 de fórmula IV (SEC ID N° 5):

- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|---|--|--|--|--|--|
| | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | Xaa | – | Xaa | – | Glu | – | Gly | – | Thr | – | Xaa | – | Thr | – | Ser | – | Asp | – | Xaa | – | Ser | – | | | | | | | | | | | | |
| | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Ser | – | Tyr | – | Leu | – | Glu | – | Xaa | – | Xaa | – | Ala | – | Ala | – | Xaa | – | Glu | – | Phe | – | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | | | | | | | | | | | | | Ile | – | Xaa | – | Trp | – | Leu | – | Val | – | Lys | – | Xaa | – | Arg | – | R | | | | | |

Fórmula IV (SEC ID N° 5)

en la que:

- Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α - metilhistidina;
- Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Met o Thr;
- Xaa en la posición 12 es: His, Trp, Phe o Tyr;
- Xaa en la posición 16 es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;
- Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;
- Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu o Gln;
- Xaa en la posición 26 es: Asp, Lys, Glu o His;
- Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;
- Xaa en la posición 35 es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o Glu;
- R en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly - Pro o se ha suprimido.

Otro grupo preferido de los compuestos de GLP - 1 está compuesto de análogos de GLP - 1 de fórmula V (SEC ID N° 6):

- | | | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| Xaa - Xaa - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - | | | | | | | | | | |
| 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 |
| Ser - Tyr - Leu - Glu - Xaa - Xaa - Xaa - Ala - Lys - Glu - Phe - | | | | | | | | | | |
| 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | | |
| Ile - Xaa - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Arg - R | | | | | | | | | | |

Fórmula V (SEC ID N° 6)

en la que:

Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α - metilhistidina;

Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;

Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu o Gln;

Xaa en la posición 24 es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;

10 Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;

R en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly - Pro o se ha suprimido.

Los compuestos preferidos GLP - 1 de fórmulas I, II, III, IV y V comprenden
15 análogos de GLP - 1 o fragmentos de análogos de GLP - 1 en los que los análogos o fragmentos contienen un aminoácido distinto de la alanina en la posición 8 (análogos de posición 8). Es preferible que estos análogos de posición 8 contengan uno o más cambios adicionales en las posiciones 9, 11, 12, 16, 18, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36 y 37 comparados con el correspondiente aminoácido de GLP - 1 (7 - 37) OH
20 nativo. También es preferible que estos análogos tengan 6 o menos cambios comparados con los correspondientes aminoácidos en GLP - 1 (7 - 37) OH o GLP - 1 (7 - 36) OH nativos. Análogos más preferidos tienen 5 ó menos cambios comparados con los correspondientes aminoácidos en GLP - 1 (7 - 37) OH o GLP - 1 (7 - 36) OH nativos o tienen 4 ó menos cambios comparados con los correspondientes aminoácidos
25 en GLP - 1 (7 - 37) OH o GLP - 1 (7 - 36) OH nativos. Incluso se prefiere aún más

que estos análogos tengan 3 o menos cambios comparados con los correspondientes aminoácidos en GLP – 1 (7 – 37) OH o GLP – 1 (7 – 36) OH nativos. Es lo más preferible que estos análogos tengan 2 ó menos cambios comparados con los correspondientes aminoácidos en GLP – 1 (7 – 37) OH nativo.

- 5 Se ha encontrado que los compuestos de fórmula II, III, IV y V tienen una propensión reducida a agregarse y generar formas insolubles. Esto también es importante en el contexto de una proteína de fusión en la que el péptido relativamente pequeño GLP – 1 debe mantener una conformación activa a pesar de estar condensado con una proteína mucho más grande. Los compuestos preferidos de GLP – 1 de fórmula
- 10 II, III, IV y V comprendidos por las proteínas de fusión de la presente invención comprenden análogos de GLP – 1 o fragmentos de análogos de GLP – 1 en los que la glicina en la posición 22 y preferiblemente la alanina en la posición 8 se han sustituido con otro aminoácido.

- Cuando la posición 22 es ácido aspártico, ácido glutámico, arginina o lisina, la
- 15 posición 8 es preferiblemente glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina. Cuando la posición 22 es un ácido sulfónico tal como ácido cisteico, la posición 8 es preferiblemente glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina.

- Otros compuestos preferidos de GLP – 1 incluyen análogos de GLP – 1 de
- 20 fórmula IV (SEC ID N° 5) en la que los análogos tienen la secuencia de GLP – 1 (7 – 37) OH excepto que el aminoácido en la posición 8 es preferiblemente glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina y la posición 30 es ácido glutámico, ácido aspártico, serina o histidina y más preferiblemente ácido glutámico.

- 25 Otros compuestos preferidos GLP – 1 incluyen análogos de GLP – 1 de fórmula

IV (SEC ID N° 5) en la que los análogos tienen la secuencia de GLP – 1 (7 – 37) OH excepto que el aminoácido en la posición 8 es preferiblemente glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina y el aminoácido en la posición 37 es histidina, lisina, arginina, treonina, serina, ácido glutámico, ácido aspártico, triptófano, tirosina, fenilalanina y más preferiblemente histidina.

Otros compuestos preferidos GLP – 1 incluyen análogos de GLP – 1 de fórmula IV (SEC ID N° 5) en la que los análogos tienen la secuencia de GLP – 1 (7 – 37) OH excepto que el aminoácido en la posición 8 es preferiblemente glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina y el aminoácido en la posición 22 es ácido glutámico, lisina, ácido aspártico o arginina y más preferiblemente ácido glutámico o lisina y el aminoácido en la posición 23 es lisina, arginina, ácido glutámico, ácido aspártico e histidina y más preferiblemente lisina o ácido glutámico.

Otros compuestos preferidos de GLP – 1 incluyen análogos de GLP – 1 de fórmula V (SEC ID N° 6) en la que los análogos tienen la secuencia de GLP – 1 (7 – 37) OH excepto que el aminoácido en la posición 8 es preferiblemente glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina y el aminoácido en la posición 22 es ácido glutámico, lisina, ácido aspártico o arginina y más preferiblemente ácido glutámico o lisina y la posición 27 es alanina, lisina, arginina, triptófano, tirosina, fenilalanina o histidina y más preferiblemente alanina.

Otros compuestos preferidos GLP – 1 incluyen análogos de GLP – 1 de fórmula II en los que la análogos tienen la secuencia de GLP – 1(7 – 37) OH excepto que el aminoácido en la posición 8 es uno, dos o tres aminoácidos seleccionados del grupo constituido por la posición 9, posición 11, posición 12, posición 16, posición 18,

26
476

posición 22, posición 23, posición 24, posición 26, posición 27, posición 30, posición 31, posición 33, posición 34, posición 35, posición 36 y posición 37, difieren del aminoácido en la posición correspondiente de GLP-1 (7-37) OH nativo.

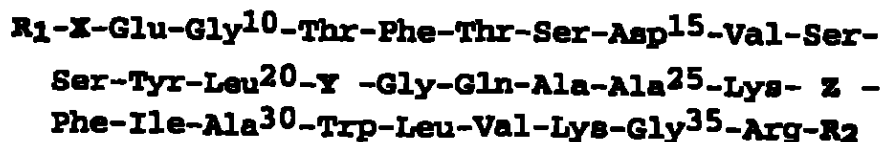
Otros compuestos GLP-1 preferidos de fórmula II incluyen:

5

Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Lys²⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Tyr³⁰-

GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH, Ala³⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ala³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ala³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly³⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Gly³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Gly³⁴-GLP-1(7-37)OH, Ala³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ala³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ala³⁵-GLP-1(7-37)OH, Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, His³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁵-GLP-1(7-37)OH, Pro³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Pro³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Pro³⁵-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Gly³⁴-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH, y Gly⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH.

Otro grupo preferido de los análogos y derivados de GLP - 1 para uso en la presente invención se compone de moléculas de fórmula VI (SEC ID N° 7)



fórmula VI (SEC ID N° 7)

en los que: R₁ se selecciona del grupo constituido por L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, alfa - fluorometilhistidina y alfa - metilhistidina; X se selecciona del grupo constituido por Ala, Gly, Val, Thr, Ile y alfa - metil - Ala; Y se selecciona del grupo constituido por Glu, Gln, Ala, Thr, Ser y Gly; Z se selecciona del grupo constituido por Glu, Gln, Ala, Thr, Ser y Gly; y R₂ es Gly - OH.

Otro grupo preferido de los compuestos GLP - 1 para uso en la presente invención se describe en el documento WO 91/11457 y consiste esencialmente en GLP - 1 (7 - 34), GLP - 1 (7 - 35), GLP - 1 (7 - 36) o GLP - 1 (7 - 37), o la amida de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que tienen al menos una modificación seleccionada del grupo constituido por:

- (a) sustitución de lisina en la posición 26 y/o posición 34 por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, arginina o D - lisina o sustitución de glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina lisina o una D - arginina,
- (b) sustitución de triptófano en la posición 31 por un aminoácido resistente a la oxidación;
- (c) sustitución de al menos uno de: valina en la posición 16; por tirosina

la serina en la posición 18 por lisina; ácido glutámico en la posición 21 por ácido aspártico; glicina en la posición 22 por serina; glutamina en la posición 23 por arginina; alanina en la posición 24 por arginina y lisina en la posición 26 por glutamina; y

5 (d) sustitución de al menos uno de: alanina en la posición 8 por glicina, serina o cisteína, ácido glutámico en la posición 9 por ácido aspártico, glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina; glicina en la posición 10 por serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina y ácido aspártico en la posición 15 por ácido glutámico; y

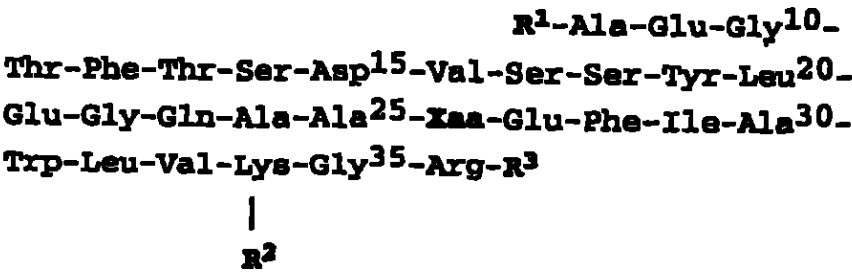
15 (e) sustitución de histidina en la posición 7 por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina, o la forma D - o N - acilada o alquilada de histidina; en la que en las sustituciones es (a), (b), (d) y (e), los aminoácidos sustituidos pueden opcionalmente estar en la forma D- y los aminoácidos sustituidos en la posición 7 pueden opcionalmente estar en la forma N - acilada o N - alquilada.

20 Ya que la enzima, dipeptidilpeptidasa IV (abreviadamente DPP IV), puede ser responsable de la rápida inactivación observada *in vivo* de GLP - 1 administrado, [véase, por ejemplo, Mentlein, R., y col., *Eur. J. Biochem.*, 214: 829 - 835 (1993)], se prefieren los análogos y derivados que están protegidos de la actividad de DPP IV en el contexto de una proteína de fusión, y se prefieren más las proteínas de fusión en las que el compuesto GLP - 1 es Gly⁸ - GLP - 1

25

(7 - 37) OH, Val⁸ - GLP - 1 (7 - 37) OH, α - metil - Ala⁸ - GLP - 1 (7 - 37) OH, o Gly⁸ - Gln²¹ - GLP - 1 (7 - 37) OH.

Otro grupo preferido de los compuestos GLP - 1 para uso en la presente invención está constituido por los compuestos de fórmula VII (SEC ID N° 8) reivindicado en la patente de Estados Unidos N° 5.512.549 que está expresamente incorporada en esta memoria descriptiva como referencia.



fórmula VII (SEC ID N° 8)

en la que R¹ se selecciona del grupo constituido por 4-imidazopropionilo, 4-imidazoacetilo o 4-imidazo-α, α dimetilacetilo; R² se selecciona del grupo constituido por acilo (C₆ - C₁₀) no ramificado o está ausente; R³ se selecciona del grupo constituido por Gly - OH o NH₂; y Xaa es Lys o Arg.

Los compuestos más preferidos de fórmula IV para uso en la presente invención son aquellos en los que Xaa es Arg y R² es acilo (C₆ - C₁₀) no ramificado. Incluso compuestos más preferidos de fórmula IV para uso en la presente invención son aquellos en los que Xaa es Arg, R² es acilo (C₆ - C₁₀) no ramificado y R³ es Gly - OH. Otros compuestos altamente preferidos de fórmula IV para uso en la presente invención son aquellos en los que Xaa es Arg, R² es acilo (C₆ - C₁₀) no ramificado, R³ es Gly - OH y R¹ es 4-imidazopropionilo. Un compuesto especialmente preferido de fórmula IV para uso en la presente invención es aquel en el que Xaa es Arg, R² es acilo C₈ no ramificado, R³ es Gly - OH y R¹ es 4-imidazopropionilo.

Preferiblemente, los compuestos GLP – 1 comprenden análogos de GLP – 1 en los que la estructura de dichos análogos o fragmentos contiene un aminoácido distinto de alanina en la posición 8 (análogos de posición 8). La estructura también puede incluir L – histidina, D – histidina o formas modificadas de histidina tales como desaminohistidina, 2-aminohistidina, β -hidroxihistidina, homohistidina α -fluorometilhistidina o α -metilhistidina en la posición 7. Es preferible que estos análogos de posición 8 contengan uno o más cambios adicionales en las posiciones 12, 16, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 33 y 37 comparados con el correspondiente aminoácido de GLP – 1 (7 – 37) OH nativo. Se prefiere más que estos análogos de posición 8 contengan uno o más cambios adicionales en las posiciones 16, 18, 22, 25, y 33 comparados con el correspondiente aminoácido de GLP – 1 (7 – 37) OH nativo.

En una realización preferida, el análogo de GLP – 1 es GLP – 1 (7 – 37) OH en el que el aminoácido en la posición 12 se selecciona del grupo constituido por triptófano o tirosina. Es más preferido que además de la sustitución en la posición 12, el aminoácido en la posición 8 se sustituya con glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina. Es incluso más preferido que además de las sustituciones en las posiciones 12 y 8, el aminoácido en la posición 22 esté sustituido con ácido glutámico.

En otra realización preferida, el análogo de GLP – 1 es GLP – 1 (7 – 37) OH en el que el aminoácido en la posición 16 se selecciona del grupo constituido por triptófano, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina. Se prefiere más que además de la sustitución en la posición 16, el aminoácido en la posición 8 se sustituya con glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina. Incluso se prefiere más que además de las sustituciones en las posiciones 16 y 8, el aminoácido en la posición 22 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere

que además de las sustituciones en las posiciones 16 y 8, el aminoácido en la posición 30 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 16 y 8, el aminoácido en la posición 37 se sustituya con histidina.

- 5 En otra realización preferida, el análogo de GLP – 1 es GLP – 1 (7 – 37) OH en el que el aminoácido en la posición 18 se selecciona del grupo constituido por triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, leucina o isoleucina, preferiblemente triptófano, tirosina e isoleucina. Se prefiere más que además de la sustitución en la posición 18, el aminoácido en la posición 8 se sustituya con glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina. Incluso se prefiere más que además de las sustituciones en las posiciones 18 y 8, el aminoácido en la posición 22 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 18 y 8, el aminoácido en la posición 30 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 18 y 8, el aminoácido en la posición 37 se sustituya con histidina.
- 10
- 15

- En otra realización preferida, el análogo de GLP – 1 es GLP – 1 (7 – 37) OH en el que el aminoácido en la posición 19 se selecciona del grupo constituido por triptófano o fenilalanina, preferiblemente triptófano. Se prefiere más que además de la sustitución en la posición 19, el aminoácido en la posición 8 se sustituya con glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina. Incluso se prefiere más que además de las sustituciones en las posiciones 19 y 8, el aminoácido en la posición 22 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 19 y 8, el aminoácido en la posición 30 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 19 y 8, el aminoácido en la posición 37 se sustituya con histidina.
- 20
- 25

En otra realización preferida, el análogo de GLP – 1 es GLP – 1 (7 – 37) OH en el que el aminoácido en la posición 20 es fenilalanina, tirosina o triptófano. Se prefiere más que además de la sustitución en la posición 20, el aminoácido en la posición 8 se sustituya con glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina. Incluso se prefiere más que además de las sustituciones en la posiciones 20 y 8, el aminoácido en la posición 22 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 20 y 8, el aminoácido en la posición 30 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 20 y 8, el aminoácido en la posición 37 se sustituya con histidina.

En otra realización preferida, el análogo de GLP – 1 es GLP – 1 (7 – 37) OH en el que el aminoácido en la posición 25 se selecciona del grupo constituido por valina, isoleucina y leucina, preferiblemente valina. Se prefiere más que además de la sustitución en la posición 25, el aminoácido en la posición 8 se sustituya con glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina. Incluso se prefiere más que además de las sustituciones en las posiciones 25 y 8, el aminoácido en la posición 22 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 25 y 8, el aminoácido en la posición 30 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 25 y 8, el aminoácido en la posición 37 se sustituya con histidina.

En otra realización preferida, el análogo de GLP – 1 es GLP – 1 (7 – 37) OH en el que el aminoácido en la posición 27 se selecciona del grupo constituido por isoleucina o alanina. Se prefiere más que además de la sustitución en la posición 27, el aminoácido en la posición 8 se sustituya con glicina, valina, leucina, isoleucina, serina,

34
484

treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina. Incluso se prefiere más que además de las sustituciones en la posiciones 27 y 8, el aminoácido en la posición 22 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 27 y 8, el aminoácido en la posición 30 se sustituya con ácido glutámico.

- 5 También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 27 y 8, el aminoácido en la posición 37 se sustituya con histidina.

- En otra realización preferida, el análogo de GLP – 1 es GLP – 1 (7 – 37) OH en el que el aminoácido en la posición 33 es isoleucina. Se prefiere más que además de la sustitución en la posición 33, el aminoácido en la posición 8 se sustituya con glicina,
10 valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y más preferiblemente valina o glicina. Incluso se prefiere más que además de las sustituciones en la posiciones 33 y 8, el aminoácido en la posición 22 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las sustituciones en las posiciones 33 y 8, el aminoácido en la posición 30 se sustituya con ácido glutámico. También se prefiere que además de las
15 sustituciones en las posiciones 33 y 8, el aminoácido en la posición 37 se sustituya con histidina.

- Los compuestos de GLP – 1 tienen modificaciones en una o más de las siguientes posiciones: 8, 12, 16, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 33 y 37. Los compuestos de GLP – 1 muestran potencia aumentada comparada con GLP – 1 (7 – 37) OH y
20 comprenden la secuencia de aminoácidos de fórmula IX (SEC ID N° 12).

**Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Gln-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-
Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Lys-Gly-Arg-Xaa₃₇**

Fórmula IX (SEC ID N° 12)

en la que:

Xaa₇ es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β -
5 hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α - metilhistidina;

Xaa₈ es: Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa₁₂ es: Phe, Trp o Tyr;

Xaa₁₆ es: Val, Trp, Ile, Leu, Phe o Tyr;

Xaa₁₈ es: Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val;

10 **Xaa₁₉** es: Tyr, Trp o Phe;

Xaa₂₀ es: Leu, Phe, Tyr o Trp;

Xaa₂₂ es: Gly, Glu, Asp o Lys;

Xaa₂₅ es: Ala, Val, Ile, o Leu;

Xaa₂₇ es: Glu, Ile o Ala;

15 **Xaa₃₀** es: Ala o Glu;

Xaa₃₃ es: Val o Ile; y

Xaa₃₇ es: Gly, His, NH₂ o está ausente.

Algunos compuestos preferidos de GLP - 1 de fórmula IX incluyen

GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)-NH₂, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Glu²²-GLP-1(7-

37)OH, Ile⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂.

Algunos compuestos preferidos GLP - 1 de fórmula IX que tienen sustituciones múltiples incluyen GLP - 1 (7 - 37) OH en el que la posición 8 es valina o glicina, la posición 22 es ácido glutámico, la posición 16 es tirosina, leucina o triptófano, la

5 posición 18 es tirosina, triptófano o isoleucina, la posición 25 es valina y la posición 33 es isoleucina. Otros compuestos GLP - 1 preferidos incluyen los siguientes: Val⁸-Try¹⁶-GLP-1 (7 -

38
488

37)OH, Val⁸-Tyr¹²-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-Phe¹⁹-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Trp¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Leu¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ile¹⁶-

Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Phe¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH; Val⁸-Trp¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Phe¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, and Val⁸-Ile¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH.

Los compuestos GLP - 1 de la presente invención también comprenden compuestos de exendina. La exendina - 3 y la exendina - 4 son péptidos biológicamente activos aislados primero de los venenos del *Helodermatidae* y se ha demostrado que se unen al receptor de GLP - 1 y estimulan la producción de H⁺ cAMP dependiente en células parietales de mamíferos. La exendina - 3 y la exendina - 4 son ambos péptidos de 39 aminoácidos que son aproximadamente homólogos en un 53% al GLP -1. Actúan como potentes agonistas de la actividad de GLP - 1. Especialmente, un derivado truncado del extremo N terminal de exendina, conocido como exendina (aminoácidos 9 - 39) es un inhibidor de exendina - 3, exendina - 4 y GLP - 1.

Un compuesto de exendina típicamente comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de exendina - 3, exendina - 4 o un análogo o fragmento de las mismas. La exendina - 3 y la exendina - 4 se describen en la patente de Estados Unidos N° 5.424.286.

La exendina - 3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 9:

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

His - Ser - Asp - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Leu - Ser -

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Lys - Gln - Met - Glu - Glu - Glu - Ala - Val - Arg - Leu - Phe -

- 2930313233343536373839

Ile – Glu – Trp – Leu – Lys – Asn – Gly – Gly – Pro – Ser – Ser -

404142434445

Gly – Ala – Pro – Pro – Pro – Ser
- 5

(SEC ID N° 9)

La exendina – 4 tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 10:

7891011121314151617

His – Gly – Glu – Gly – Thr – Phe – Thr – Ser – Asp – Leu – Ser -

1819202122232425262728

10Lys – Gln – Met – Glu – Glu – Glu – Ala – Val – Arg – Leu – Phe -

2930313233343536373839

Ile – Glu – Trp – Leu – Lys – Asn – Gly – Gly – Pro – Ser – Ser -

404142434445

Gly – Ala – Pro – Pro – Pro – Ser
- 15

15

(SEC ID N° 10)

Los compuestos GLP – 1 también incluyen fragmentos de exendina que son polipéptidos obtenidos después del truncamiento de uno o más aminoácidos del extremo N terminal y/o extremo C terminal de exendina o un análogo de exendina. Además, los

20 compuestos de GLP – 1 incluyen polipéptidos de exendina en los que uno o más aminoácidos se han añadido al extremo N terminal y/o extremo C terminal de exendina o fragmentos de los mismos. Los compuestos de exendina de este tipo tienen hasta aproximadamente cuarenta y cinco aminoácidos.

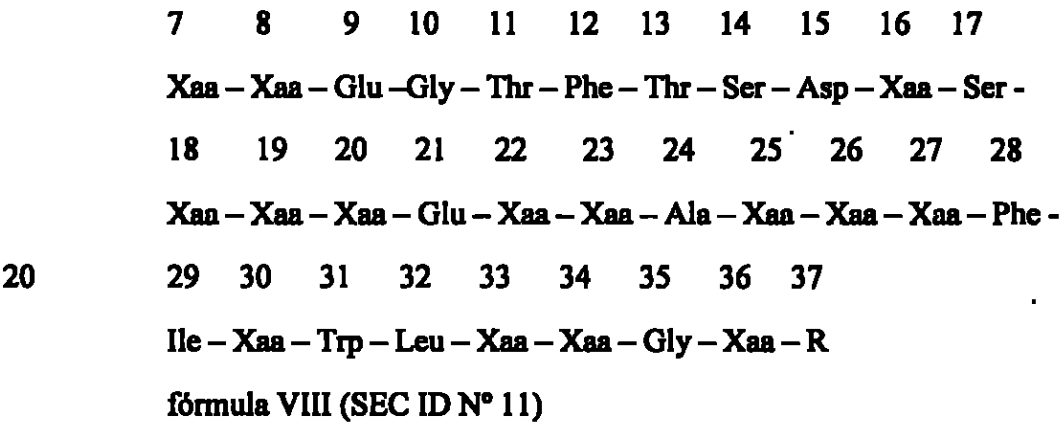
Los compuestos GLP – 1 también incluyen “análogos de exendina”. Un análogo

25 de exendina tiene suficiente homología con la exendina – 4, exendina – 3 o un

fragmento de las mismas de tal manera que el análogo tiene actividad insulínica. La actividad de los fragmentos de exendina y/o análogos se pueden valorar utilizando ensayos *in vitro* tales como los descritos en el documento EP 619.322 y la patente de Estados Unidos 5.120.712.

5 Preferiblemente, un análogo de exendina tiene la secuencia de aminoácidos de la exendina - 4 o un fragmento de la misma, modificada de manera que entre uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos son diferentes del aminoácido en la posición correspondiente de la exendina - 4 o el fragmento de exendina - 4. En la nomenclatura utilizada en esta memoria descriptiva para designar compuestos de exendina, el
10 aminoácido sustituyente y su posición se indican antes de la estructura parental. Por ejemplo, Val⁸ - exendina - 4 designa un compuesto de exendina en el que la glicina que normalmente se encuentra en la posición 8 de la exendina - 4 se ha sustituido con valina.

 Otro grupo preferido de los compuestos GLP - 1 se compone de GLP - 1/
15 análogos de exendina-4 de fórmula VIII (SEC ID N° 11).



 en la que:
 Xaa en la posición 7 es L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 -
25 aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α -

metilhistidina;

- Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala o Val;
- Xaa en la posición 16 es: Leu o Val;
- Xaa en la posición 18 es: Lys o Ser;
- 5 Xaa en la posición 19 es: Gln o Tyr;
- Xaa en la posición 20 es: Met o Leu;
- Xaa en la posición 22 es: Glu o Gln;
- Xaa en la posición 23 es: Glu o Gln;
- Xaa en la posición 25 es: Val o Ala;
- 10 Xaa en la posición 26 es: Arg o Lys;
- Xaa en la posición 27 es: Leu o Glu;
- Xaa en la posición 30 es: Glu o Ala;
- Xaa en la posición 33 es: Val o Lys;
- Xaa en la posición 34 es: Asn o Lys;
- 15 Xaa en la posición 36 es: Gly o Arg; y

R en la posición 37 es: Gly, Pro, Pro – Ser – Ser – Gly – Ala – Pro – Pro – Pro – Ser o está ausente. La actividad de 18 especies diferentes que caen dentro de este género se proporciona en la tabla 6.

Además los análogos de exendina que son útiles en la presente invención se describen en las publicaciones de las patentes PCT WO 99/25728 (Beeley y col.), WO 99/25727 (Beeley y col.), WO 98/05351 (Young y col.), WO 99/40788 (Young y col.), WO 99/07404 (Beeley y col.) y WO 99/43708 (Knudsen y col.).

Las proteínas de fusión de GLP – 1 de la presente invención pueden comprender sitios de glicosilación. La glicosilación es una modificación química en la que restos de azúcar se añaden a la proteína en sitios específicos. La glicosilación de proteínas juega

un papel para asegurar la carga correcta, confirmación y estabilidad la proteína de maduración y puede dirigir la proteína a la superficie de la célula y a una secreción eventual de la proteína. Lo más importante es que, la glicosilación efectúa la tasa de eliminación de muchas proteínas *in vivo*. Los azúcares pueden estar O - unidos o N - unidos- En general, los azúcares O - unidos se añaden al oxígeno del grupo hidroxilo de la serina y treonina, mientras que los azúcares N - unidos se añaden al nitrógeno amida de la asparagina. El sitio de consenso de la N - glicosilación es Asn X1 X2 siendo X1 cualquier aminoácido excepto Pro y X2 es Ser o Thr.

Los compuestos GLP - 1 generalmente no se glicosilan *en vivo*; sin embargo, es de interés que las proteínas de fusión de GLP - 1 de la presente invención que comprenden un compuesto GLP - 1 con una extensión del extremo C terminal condensado con una secuencia Fc se glicosilan en la última serina en la extensión del extremo C terminal (SSGAPPPS*) y en la treonina en la posición 11 en la región del extremo N terminal de Fc (AEPKSCDKTHT*CPPC . . .).

15

Proteínas de fusión Fc heterólogas

Los compuestos GLP - 1 descritos anteriormente se pueden condensar directamente o mediante un engarce de péptidos a la porción Fc de una inmunoglobulina.

20

Las inmunoglobulinas son moléculas que contienen cadenas de polipéptidos que se mantienen juntas por medio de enlaces disulfuro, que tienen típicamente dos cadenas ligeras y dos cadena pesadas. En cada cadena un dominio (V) tiene una secuencia de aminoácidos variable dependiendo de la especificidad de anticuerpo de la molécula. Los otros dominios (C) tienen una secuencia bastante constante común con las moléculas de

25

la misma clase.

Como se utiliza en esta memoria descriptiva, la porción Fc de una inmunoglobulina tiene el significado comúnmente dado al término en el campo de la inmunología. Específicamente, este término se refiere a un fragmento de anticuerpo que se obtiene retirando las dos regiones de unión del antígeno (fragmentos Fab) del anticuerpo. Una forma para retirar los fragmentos Fab es digerir la inmunoglobulina con proteasa de papaína. De este modo, la porción Fc se forma a partir de fragmentos de tamaño aproximadamente igual de la región constante de ambas cadenas pesadas, que se asocian a través de interacciones no covalentes y enlaces disulfuro. La porción Fc puede incluir las regiones flexibles y se extienden mediante los dominios CH₂ y CH₃ al extremo C terminal del anticuerpo. Las regiones flexibles representativas de las inmunoglobulinas de seres humanos y ratones se pueden encontrar en Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck, C. A. K., ed., W. H. Freeman and Co., 1992, las enseñanzas de las cuales se incorporan en esta memoria descriptiva como referencia. La porción Fc puede además incluir uno o más sitios de glicosilación. La secuencia de aminoácidos de una proteína de Fc representativa contiene una región flexible, dominios CH₂ y CH₃ y un sitio de N-glicosilación en la posición 82 se muestran en la figura 1.

Hay cinco tipos de regiones Fc de inmunoglobulinas humanas con efecto diferente o y propiedades farmacocinéticas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. La IgG es la inmunoglobulina más abundante en suero. La IgG también tiene la semivida más larga en suero de todas las inmunoglobulinas (23 días). A diferencia de otras inmunoglobulinas, la IgG se recircula eficientemente después de la unión a un receptor de Fc. Hay cuatro subclases de IgG G1, G2, G3 y G4, cada una de las cuales tiene diferente efecto o funciones. G1, G2 y G3 se pueden unir a C1q y fijar el complemento mientras la G4 no puede. Incluso aunque la G3 es capaz de unirse a C1q más

eficazmente que G1, G1 es más eficaz en la mediación de la lisis celular dirigida por el complemento. G2 fija el complemento muy ineficazmente. El sitio de unión a C1q en IgG se localiza en la región carboxi terminal del dominio CH₂.

Todas las subclases de IgG son capaces de unirse a los receptores de Fc (CD16, CD32, CD64) siendo G1 y G3 más eficaces que G2 y G4. La región de unión al receptor de Fc de IgG se forma mediante restos localizados tanto en la región flexible como en las regiones carboxi terminal del dominio CH₂.

La IgA puede existir tanto en forma monomérica como dimérica que se mantienen unidas por una cadena J. La IgA es la segunda Ig más abundante en el suero, pero tiene una semivida de 6 días solamente. La IgA tiene tres efectos o funciones. Se une a un receptor específico de IgA en macrófagos y eosinófilos, que conducen la fagocitosis y la desgranulación respectivamente. También puede fijar el complemento mediante una vía alternativa desconocida.

La IgM se expresa en forma bien de pentámero o hexámero, ambas formas se mantienen juntas mediante una cadena J. La IgM tiene una semivida en suero de 5 días. Se une débilmente a C1q mediante un sitio de unión localizado en su dominio CH₃. La IgD tiene una semivida de 3 días en suero. No está claro qué efecto o funciones se atribuyen a esta Ig. La IgE es una Ig monomérica y tiene una semivida en suero de 2,5 días. La IgE se une a dos receptores de Fc que conducen la desgranulación y dan como resultado la liberación de agentes proinflamatorios.

Dependiendo del efecto deseado *in vivo*, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener cualquiera de los isotipos descritos anteriormente o pueden contener regiones de Fc mutadas en las que las funciones de unión al complemento y/o al receptor de Fc se han alterado. De este modo, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener la porción Fc entera de una

inmunoglobulina, los fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina, o análogos de los mismos condensados con un compuesto GLP – 1.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden constar de proteínas de cadena sencilla o polipéptidos de cadena múltiple. Dos o más proteínas de fusión de Fc se pueden producir de manera que interactúen mediante enlaces disulfuro que se forman naturalmente entre las regiones Fc. Estos multímeros pueden ser homogéneos con relación al compuesto GLP -1 o pueden contener diferentes compuestos GLP – 1 condensados en el extremo N terminal de la porción Fc de la proteína de fusión.

Independientemente de la estructura final de la proteína de fusión, las regiones Fc o de tipo Fc deben servir para prolongar la semivida *in vivo* en plasma del compuesto GLP – 1 condensado al extremo N terminal. Además, el compuesto GLP – 1 condensado debe mantener alguna actividad biológica. Se puede demostrar un aumento en la semivida utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 7 en el que la semivida de la proteína de fusión se compara con la semivida del compuesto de GLP – 1 solo. La actividad biológica se puede determinar mediante procedimientos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. Los ensayos biológicos representativos se describen en los ejemplos 6, 8 y 9.

Ya que la región Fc de la IgG producida mediante proteólisis tiene la misma semivida *in vivo* que la molécula intacta de IgG y los fragmentos Fab se degradan rápidamente, se cree que la secuencia relevante para prolongar la semivida reside en los dominios CH₂ y CH₃. Además, se ha mostrado en la bibliografía que las velocidades catabólicas de las variantes de IgG que no se unen al receptor de Fc de alta afinidad o C1q son indistinguibles de la velocidad de eliminación del anticuerpo de tipo natural parental, indicando que el sitio catabólico es distinto de los sitios implicados en la unión al receptor de Fc o C1q. [Wawrzynczak y col., (1992) *Molecular Immunology* 29: 221].

Los estudios de mutagénesis específica puntual que usan una región Fc de IgG1 murina sugerían que el sitio de la región Fc de IgG1 que controla la velocidad metabólica se localiza en la interfase del dominio de CH₂ y CH₃.

En función de estos estudios, las regiones Fc se pueden modificar en el sitio
5 catabólico para optimizar la semivida de las proteínas de fusión. Es preferible que la región Fc utilizada para las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención se derive de una región Fc de una IgG1 o de una IgG4. Incluso se prefiere más que la región Fc sea IgG4 o derivada de IgG4. Preferiblemente la región Fc de IgG contiene ambas regiones CH₂ y CH₃ que incluyen la región flexible (área en la molécula de
10 inmunoglobulina que contiene muchos residuos del aminoácido prolina y es donde el fragmento Fc une uno de los dos fragmentos Fab (nota del traductor)).

Proteínas de fusión heterólogas de albúmina

Los compuestos de GLP - 1 descritos anteriormente se pueden condensar
15 directamente o mediante un engarce de péptidos a albúmina o un análogo, fragmento o derivado de la misma.

En general, las proteínas de albúmina que forman parte de las proteínas de fusión de la presente invención se pueden derivar a partir de albúmina clonada de cualquier especie. Sin embargo, se prefieren la albúmina humana y los fragmentos y
20 análogos de la misma para reducir el riesgo de que la proteína de fusión sea inmunogénica en seres humanos. La albúmina de suero humano (abreviadamente HSA) consta de una cadena polipeptídica no glicosilada de 585 aminoácidos con un peso molecular de la fórmula de 66.500. La secuencia de aminoácidos de la HSA humana se muestra en la figura 2. [Véase Meloun y col (1975) FEBS Letters 58: 136; Behrens y
25 col, (1975) Fed. Proc. 34: 591; Lawn y col. (1981) Nucleic Acids Research 9: 6102 -

6114; Minghetti y col., (1986) J. Biol Chem. 261: 6747]. Se han descrito una diversidad de variantes polimórficas así como análogos y fragmentos de albúmina. [Véase Weitkamp y col., (1973) Ann. Hum. Genet. 37: 219]. Por ejemplo, en el documento EP 322.094, los inventores describen diversas formas más pequeñas de.
5 HSA. Algunos de estos fragmentos incluyen HSA (1 – 373), HSA (1 – 388), HSA (1 – 389), HSA (1 – 369) y HSA (1 – 419) y fragmentos entre 1 – 369 y 1 – 419. El documento 399.666 describe fragmentos de albúmina que incluyen HSA (1 – 177) y HSA (1 – 200) y fragmentos entre HSA (1 – 177) y HSA (1 – 200).

Se entiende que las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención
10 incluyen compuestos GLP – 1 que se acoplan a cualquier proteína de albúmina que incluye fragmentos, análogos y derivados en los que dicha proteína de fusión es biológicamente activa y tiene una semivida en plasma más larga que el compuesto de GLP – 1 solo. De este modo, la porción de albúmina de la proteína de fusión no necesita necesariamente tener una semivida en plasma igual a la de la albúmina humana nativa.
15 Se conocen o se pueden generar los fragmentos, análogos y derivados que tengan semividas más largas o que tengan semividas intermedias a las la de albúmina humana nativa y el compuesto de GLP – 1 de interés.

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención comprenden proteínas que tienen sustituciones conservadoras de aminoácidos en el compuesto GLP
20 – 1 y/o la porción de Fc o de albúmina de la proteína de fusión. Una “sustitución conservadora” es el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene la misma carga neta electrónica y aproximadamente el mismo tamaño y forma. Los aminoácidos con cadenas laterales de aminoácidos alifáticas o alifáticas sustituidas tienen aproximadamente el mismo tamaño cuando número total de carbonos y
25 heteroátomos en sus cadena laterales difieren en no más de aproximadamente cuatro.

Tienen aproximadamente la misma forma cuando el número total de ramificaciones en sus cadenas laterales difiere en no más de uno. Los aminoácidos con grupos fenilo o fenilo sustituidos en sus cadenas laterales se considera que tienen aproximadamente el mismo tamaño y forma. Excepto que en esta memoria descriptiva se especifique otra cosa, las sustituciones conservadoras se hacen preferiblemente con aminoácidos de origen natural.

Sin embargo, el término "aminoácido" se utiliza en esta memoria descriptiva en su sentido más amplio e incluye aminoácidos de origen natural así como aminoácidos de origen no natural, incluyendo análogos y derivados de aminoácidos. Esto último incluye moléculas que contienen un resto aminoácido. Un experto en la técnica reconocerá, en vista de esta amplia definición, que la referencia en esta memoria descriptiva de un aminoácido incluye, por ejemplo, aminoácidos L proteogénicos de origen natural; aminoácidos D; aminoácidos químicamente modificados tales como los análogos y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos de origen natural tales como norleucina, β - alanina, ornitina, GABA, etc.; y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica que son características de aminoácidos. Como se utiliza en esta memoria descriptiva el término "proteogénico" indica que el aminoácido se puede incorporar a un péptido, polipéptido o proteína en una célula mediante una vía metabólica.

La incorporación de aminoácidos no naturales, que incluyen aminoácidos no nativos sintéticos, aminoácidos sustituidos o uno o más aminoácidos D en las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención puede ser ventajosa en numerosas formas diferentes. Los péptidos que contienen aminoácidos D etc., exhiben una estabilidad incrementada *in vitro* o *in vivo* comparada con los homólogos que contienen aminoácidos L. De este modo, la construcción de los péptidos, etc., que incorporan

aminoácidos D puede ser particularmente útil cuando se desea o se requiere una estabilidad intracelular mayor. Más específicamente, los péptidos D, etc., son resistentes a peptidasas y proteasas endógenas, proporcionando por lo tanto una biodisponibilidad mejorada de la molécula y vidas prolongadas *in vivo* cuando se descan tales propiedades. Adicionalmente, los péptidos D, etc., no se pueden elaborar eficazmente para una presentación principal de histocompatibilidad de complejo clase II restringido respecto a las células auxiliares T, y por lo tanto es menos probable que induzcan respuestas inmunes humorales en el organismo entero.

Además de los análisis estructura/función de los diversos polipéptidos comprendidos en la presente invención, hay numerosos factores que se pueden considerar cuando se seleccionan los aminoácidos para sustitución. Un factor que se puede considerar para hacer tales cambios es el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos que confiere la función interactiva biológica en una proteína la han descrito Kyte y Doolittle (1982, *J. Mol. Biol.*, 157: 105 – 132). Se acepta que el carácter hidropático relativo de los aminoácidos contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante. Esto, a su vez, afecta a la interacción de la proteína con moléculas tales como enzimas, sustratos, receptores, ligandos, DNA, anticuerpos, antígenos, etc. En función de su hidrofobicidad y características de carga, cada aminoácido se le ha asociado un índice hidropático como sigue:

Isoleucina (+ 4,5); valina (+ 4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+ 2,8); cisteína/cistina (+ 2,5); metionina (+ 1,9); alanina (+ 1,8); glicina (- 0,4); treonina (- 0,7); serina (- 0,8); triptófano (- 0,9); tirosina (- 1,3); prolina (- 1,6); histidina (- 3,2); glutamato/glutamina/aspartato/asparagina (- 3,5); lisina (- 3,9); y arginina (- 4,5).

Como se sabe en la técnica, ciertos aminoácidos en un péptido, polipéptido o

50
500

proteína se pueden sustituir con otros aminoácidos que tengan un índice o valor hidropático similar y así producir un péptido resultante, etc, que tenga una actividad biológica similar o incluso mejorada. Cuando se hacen tales cambios es preferible que los aminoácidos que tienen índices hidropáticos entre ± 2 se sustituyan con otro. Las
5 sustituciones más preferidas son aquellas en las que los aminoácidos tienen índices hidropáticos entre ± 1 . Las sustituciones más preferidas son aquellas en las que los aminoácidos tienen índices hidropáticos dentro de $\pm 0,5$.

Los aminoácidos similares se pueden sustituir también en función de la hidrofiliidad. La patente de Estados Unidos N° 4.554.101 describe que la mayor
10 hidrofiliidad media local de una proteína, según se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Se han asignado a los aminoácidos los siguientes los siguientes valores de hidrofiliidad: arginina/lisina (+ 3,0); aspartato/glutamato (+ 3,0 $\pm$ 1); serina (+ 0,3); asparagina/glutamina (+ 0,2); glicina (0); treonina (- 0,4); prolina (- 0,5 $\pm$ 1);
15 alanina/histidina (- 0,5); cisteína (- 1,0); metionina (- 1,3); valina (- 1,5); leucina/isoleucina (- 1,8); tirosina (- 2,3); fenilalanina (- 2,5); y triptófano (- 3,4). De este modo, un aminoácido en un péptido, polipéptido o proteína se puede sustituir con otro aminoácido que tenga un valor similar de hidrofiliidad y así producir un péptido resultante, etc, que tenga una actividad biológica similar, es decir manteniendo todavía
20 una correcta función biológica. Cuando se hacen tales cambios, los aminoácidos que tienen índices hidropáticos dentro de ± 2 se sustituyen preferiblemente con otro, se prefieren más los que están dentro de ± 1 y los más preferidos son los que están dentro de $\pm 0,5$.

Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de los aminoácidos en las
25 proteínas de fusión de la presente invención se pueden basar en la semejanza relativa de

los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, etc. Además, las sustituciones se pueden realizar en función de la propensión de la estructura secundaria. Por ejemplo, un aminoácido helicoidal se puede sustituir con un aminoácido que preservara la estructura helicoidal. Las sustituciones ejemplares que tienen en cuenta diversas de las características anteriores con el fin de producir cambios conservadores de aminoácidos que dan como resultado cambios silenciosos en los péptidos presentes, etc., se pueden seleccionar de otros miembros de la clase a la que los aminoácidos de origen natural pertenecen. Los aminoácidos se pueden dividir en los siguientes cuatro grupos: (1) aminoácidos ácidos; (2) aminoácidos básicos; (3) aminoácidos polares neutros; y aminoácidos (4) aminoácidos no polares neutros.

Procedimientos generales para la preparación de proteínas de fusión heterólogas de la presente invención.

Aunque las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención se pueden preparar mediante una diversidad de diferentes procedimientos, se prefieren los procedimientos de recombinación. Para propósitos de la presente invención, como se describe y se reivindica en la presente invención, se definen más adelante los siguientes términos y abreviaturas de biología molecular general. Los términos y abreviaturas utilizados en este documento tienen sus significados normales a no ser que se indique otra cosa. Por ejemplo, "°C" se refiere a grados Celsius; "mmol" se refiere a milimol o milimoles; "mg" se refiere a miligramos; "µg" se refiere a microgramos; "ml" se refiere a mililitros; y "µl" se refiere a microlitros. Las abreviaturas de los aminoácidos son como se indica en 37 C. F. R. § 1.822 (b) (2) (1994).

"Pares de bases" o "bp" como se utiliza en esta memoria descriptiva se refiere a

DNA o RNA. Las abreviaturas A, C, G, y T, cuando se presentan en moléculas de DNA, corresponden a las formas 5' – monofosfato de los desoxirribonucleósidos (desoxi) adenosina, (desoxi) citidina, (desoxi) guanosina y timidina respectivamente. Las abreviaturas U, C, G y A, cuando se presentan en moléculas de RNA, corresponden a las formas 5' – monofosfato de los ribonucleósidos uridina, citidina, guanosina y adenosina respectivamente. En el DNA de doble cadena, el par de bases se refiere a la asociación de A con T o C con G. En un DNA/RNA, el par de bases heterodúplex puede referirse a una asociación de A con U o C con G. (Véase la definición de “complementario” más adelante.)

10 “Digestión” o “restricción” de DNA se refiere a la escisión catalítica del DNA con una enzima de restricción que actúa solamente en ciertas secuencias en el DNA (“endonucleasas de secuencias específicas”). Las diversas enzimas de restricción utilizadas en esta memoria descriptiva están comercialmente disponibles y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requerimientos se utilizaron como conocen
15 los expertos en la técnica. Las cantidades de tampones y sustrato adecuadas para las enzimas de restricción particulares se especifican por el fabricante o se pueden encontrar fácilmente en la bibliografía.

“Ligación” se refiere al procedimiento de formación enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de doble cadena. A no ser que se indique otra cosa, la
20 ligación se puede llevar a cabo utilizando tampones y condiciones conocidas con una ligasa de DNA, tal como T4 DNA ligasa.

“Plásmido” se refiere a elemento genético de autorreplicación extracromosomal (usualmente). Los plásmidos se designan generalmente mediante una minúscula “p” seguido de letras y/o números. Los plásmidos de partida en esta memoria descriptiva
25 están, o bien comercialmente disponibles, disponibles públicamente en función no

restringida, o se pueden construir a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con procedimientos publicados. Además, los plásmidos equivalentes a los descritos se conocen en la técnica y serán evidentes para los expertos en la técnica.

5 “Vector de clonación de DNA recombinante” como se utiliza en esta memoria descriptiva se refiere a cualquier agente de replicación autónomo, incluyendo, pero no limitado a, plásmidos y fagos, que comprenden una molécula de DNA a la que se pueden añadir o se han añadido uno o más segmentos adicionales de DNA.

10 “Vector de expresión de DNA recombinante” como se utiliza en esta memoria descriptiva se refiere a cualquier vector de clonación de DNA recombinante en el que se ha incorporado un promotor para controlar la transcripción del DNA insertado.

“Transcripción” se refiere al procedimiento por el que la información contenida en una secuencia de nucleótidos de DNA se transfiere a una secuencia complementaria de RNA.

15 “Transfección” se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped se expresen o no, de hecho, las secuencias de codificación. Los expertos en la técnica conocen numerosos procedimientos de transfección, por ejemplo, coprecipitación con fosfato cálcico, transfección de liposomas y electroporación. La transfección exitosa se reconoce generalmente cuando se produce cualquier indicación
20 de la operación de este vector en la célula huésped.

“Transformación” se refiere a la introducción de DNA en un organismo de manera que el DNA es replicable, bien como un elemento extracromosomal o por integración cromosomal. Los procedimientos de transformación de las células huésped eucarióticas y bacterianas se conocen bien en la técnica, muchos de estos
25 procedimientos, tales como inyección nuclear, fusión protoplástica o tratamiento con

calcio usando cloruro de calcio se resumen en J. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1989). En general, cuando se introduce DNA en levaduras el término transformación se utiliza en sentido opuesto al término transfección.

5 “Traducción” como se utiliza en esta memoria descriptiva se refiere al procedimiento en el que la información genética del RNA mensajero (mRNA) se utiliza para especificar y dirigir la síntesis de una cadena de polipéptidos.

10 “Vector” se refiere a un compuesto de ácido nucleico utilizado para la transfección y/o transformación de células en la manipulación génica soportando secuencias de polinucleótidos correspondientes a moléculas de proteínas adecuadas que, cuando se combinan con secuencias de control adecuadas, confiere propiedades específicas en la célula huésped que se van a transfectar y/o transformar. Los plásmidos, virus y bacteriófagos son vectores adecuados. Los vectores artificiales se construyen cortando y uniendo moléculas de DNA a partir de fuentes diferentes utilizando enzimas y ligasas de restricción. El término “vector” como se utiliza en esta memoria descriptiva
15 incluye vectores de clonación de DNA recombinante y vectores de expresión de DNA recombinante.

20 “Complementario” o “complementación” como se utiliza en esta memoria descriptiva, se refiere a pares de bases (purinas y pirimidinas) que se asocian mediante enlaces hidrógeno en un ácido nucleico de doble cadena. Los siguientes pares de bases son complementarios; guanina y citosina; adenina y timina; y adenina y uracilo.

25 “Hibridación” como se utiliza en esta memoria descriptiva se refiere a un procedimiento en el que una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria mediante un apareamiento de bases. Las condiciones empleadas en la hibridación de dos ácidos nucleicos complementarios no idénticos, pero muy similares, varían con el grado de complementación de las dos cadenas y la longitud de las cadenas.

Tales técnicas y condiciones son bien conocidas por los expertos en la técnica.

“Secuencia de aminoácidos aislados” se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos, construida o sintetizada, que es posicionalmente distinta de la secuencia de origen natural.

- 5 “Compuesto de DNA aislado” se refiere a cualquier secuencia de DNA, construida o sintetizada, que es posicionalmente distinta de su localización natural en DNA genómico.

- 10 “Compuesto de ácido nucleico aislado” se refiere a cualquier secuencia de DNA o RNA, construida o sintetizada, que es posicionalmente distinta de su localización natural.

“Cebador” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona como sustrato iniciador de una elongación enzimática o sintética.

“Promotor” se refiere a una secuencia de DNA que dirige la transcripción de DNA a RNA.

- 15 “Sonda” se refiere a un compuesto de ácido nucleico o fragmento del mismo, que se hibrida con otro compuesto de ácido nucleico.

- 20 “Rigurosidad” de las reacciones de hibridación se determina fácilmente por un experto en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más altas para una hibridación apropiada, mientras que sondas pequeñas necesitan temperaturas menores. Generalmente la hibridación depende de la capacidad del DNA desnaturalizado para rehibridarse cuando están presentes cadenas complementarias en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable
25 más alta puede ser la temperatura relativa utilizada. Como resultado, las temperaturas

relativas más altas tenderán a hacer las reacciones más rigurosas, mientras temperaturas inferiores lo hacen menos. Para detalles adicionales y explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, 1995.

- 5 “Condiciones rigurosas” o “condiciones altamente rigurosas” como se definen en esta memoria descriptiva, se pueden identificar como aquellas que (1) emplean intensidad iónica baja y temperatura alta de lavado, por ejemplo, cloruro sódico 15 mM / citrato sódico 1,5 mM / dodecilsulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) emplean un agente desnaturizante durante la hibridación, tal como formamida, por ejemplo, formamida al
- 10 50% (v/v) con albúmina sérica bovina al 0,1% / ficoll al 0,1% / polivinilpirrolidona al 0,1% / tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM / citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5X SSC (cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución de 5X Denhardt, DNA de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al
- 15 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C con lavados a 42°C en 0,2X SSC (cloruro sódico 30 mM / citrato sódico 3 mM) y formamida al 50% a 55°C seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1X que contiene EDTA a 55°C.

- “Condiciones moderadamente rigurosas” se pueden identificar como se describe en el documento de Sambrook y col., [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- 20 Nueva York: Cold Spring Harbor Press, (1989)], e incluye el uso de soluciones de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, intensidad iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5X SSC (cloruro sódico 750 mM, citrato sódico
- 25 75 mM), fosfato sódico 50 mM a pH 7,6, solución de Denhardt 5X, sulfato de dextrano

al 10% y 20 mg/ml de DNA de espermatozoides de salmón tundido y desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros una vez con SSC a aproximadamente 37 – 50°C. Los expertos en la técnica reconocerán como ajustar la temperatura, intensidad iónica, etc., según se necesite para acomodar los factores tales como la longitud de la sonda y similares.

- 5 “PCR” se refiere a la ampliamente conocida reacción en cadena con polimerasa que emplea una polimerasa de DNA térmicamente estable.

“Secuencia guía” se refiere a una secuencia de aminoácidos que se puede separar enzimática o químicamente para producir el polipéptido deseado de interés.

- 10 “Secuencia de señal de secreción” se refiere a una secuencia de aminoácidos que generalmente está presente en la región N terminal de un polipéptido más grande que funciona para iniciar la asociación de ese polipéptido con los compartimientos de la membrana celular como el retículo endoplásmico y la secreción de ese polipéptido a través de la membrana plasmática.

- 15 *Construcción de DNA que codifica las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención:*

- Las proteínas de albúmina de tipo natural e inmunoglobulina se pueden obtener de una diversidad de fuentes. Por ejemplo, estas proteínas se pueden obtener a partir de genotecas de cDNA preparadas a partir de tejido o células que expresan el mRNA de
20 interés a un nivel detectable. Las genotecas se pueden analizar con sondas diseñadas usando el DNA publicado o secuencia de proteínas para la proteína particular de interés. Por ejemplo, las regiones constantes de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina se describen en Adams y col., (1980) Biochemistry 19: 2711 – 2719; Goughet y col., (1980) Biochemistry 19: 2702 – 2710; Dolby y col., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 77: 6027 – 6031; Rice y col., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados
25 Unidos 77: 6027 – 6031; Rice y col., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados

Unidos 79: 7862 – 7862; Falkner y col., (1982) Nature 298: 286 – 288; y Morrison y col (1984) Ann. Rev. Immunol. 2: 239 – 256. Algunas referencias que describen la proteína de albúmina y secuencias de DNA incluyen Meloun y col., (1975) FEBS Letters 58: 136; Behrens y col., (1975) Fed. Proc. 34: 591; Lawn y col. (1981) Nucleic Acids Research 9: 6102 – 6114; y Minghetti y col., (1986) J. Biol. Chem. 261: 6747.

El análisis de una genoteca de cDNA con la sonda seleccionada se puede llevar a cabo usando procedimientos estándar, tales como los descritos en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989). Un medio alternativo para aislar un gen que codifica una proteína de albúmina o inmunoglobulina es usar la metodología PCR [Sambrook y col., más arriba; Dieffenbach y col., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1995)]. Los cebadores en PCR se pueden diseñar en función de secuencias publicadas.

Generalmente las secuencias de tipo natural que contienen todo el gen clonadas a partir de especies particulares pueden servir como molde para crear análogos, fragmentos y derivados que mantienen la capacidad de conferir una semivida en plasma más larga en el compuesto GLP – 1 que es parte de la proteína de fusión. Se prefiere que las porciones de Fc y albúmina de las proteínas de fusión heterólogas se deriven a partir de la secuencia humana nativa con el fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad potencial de la proteína de fusión en seres humanos.

En particular, se prefiere que la porción de inmunoglobulina de una proteína de fusión comprendida por la presente invención contenga solamente un fragmento Fc de la inmunoglobulina. Dependiendo de si se desean efecto o funciones particulares y de las características estructurales en la proteína de fusión, un fragmento Fc puede contener las regiones flexibles junto con los dominios CH₂ y CH₃ o alguna otra combinación de

los mismos. Estos fragmentos Fc se pueden generar utilizando técnicas de PCR con cebadores diseñados para hidridarse a secuencias correspondientes a los extremos deseados del fragmento. De manera similar, si se desean los fragmentos de albúmina, los cebadores en PCR se pueden diseñar para que sean complementarios a las
5 secuencias internas de albúmina. Los cebadores en PCR también se pueden diseñar para crear sitios de enzimas de restricción para facilitar la clonación en los vectores de expresión.

El DNA que codifica los compuestos GLP – 1 de la presente invención se puede preparar mediante una diversidad de procedimientos diferentes que incluyen
10 procedimientos de clonación similares a los descritos anteriormente así como DNA sintetizado químicamente. La síntesis química puede ser atractiva dada la corta longitud del péptido codificado. Se ha publicado la secuencia de aminoácidos de GLP – 1 así como la secuencia del gen de preproglucagón. [López y col., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. , Estados Unidos 80: 5485 – 5489; Bell y col., (1983) Nature, 302: 716 – 718;
15 Heinrich, G. y col (1984) Endocrinol, 115: 2176 – 2181; Ghiglione, M. y col. (1984) Diabetologia 27: 599 - 600]. De este modo, se pueden diseñar cebadores para compuestos de GLP – 1 nativos de PCR y fragmentos de los mismos.

Después el gen que codifica una proteína de fusión se puede construir ligando el DNA que codifica un compuesto GLP – 1 en fase al DNA que codifica una proteína de
20 albúmina o de Fc. El gen que codifica el compuesto de GLP – 1 y el gen que codifica la proteína de albúmina o de Fc también se pueden unir en fase mediante DNA que codifica un engarce peptídico.

La función y estabilidad *in vivo* de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención se pueden optimizar mediante la adición de engarces de péptidos
25 pequeños para evitar potencialmente las interacciones de dominios no deseadas. Aunque

estos engarces pueden potencialmente ser de cualquier longitud y estar constituidos por cualquier combinación de aminoácidos, se prefiere que la longitud no sea mayor que la necesaria para evitar las interacciones no deseadas de dominios y/o optimizar la actividad y/o estabilidad biológica. En general, los engarces no deben contener

5 aminoácidos con cadenas laterales extremadamente voluminosas o aminoácidos apropiados para introducir estructuras secundarias significativas. Se prefiere que el engarce sea rico en serina – glicina y tenga menos de 30 aminoácidos de longitud. Se prefiere más que el engarce no tenga más de 20 aminoácidos de longitud. Incluso se prefiere más que el engarce no tenga más de 15 aminoácidos de longitud. Un engarce

10 preferido contiene repeticiones de la secuencia Gly – Gly – Gly – Gly – Ser. Se prefiere que haya entre 2 y 6 repeticiones de esta secuencia. Incluso se prefiere más que haya entre 3 y 4 repeticiones de esta secuencia.

El DNA que codifica el GLP – 1 de tipo natural, albúmina y polipéptidos de Fc y fragmentos de los mismos se pueden mutar tanto antes de la ligación como en el

15 contexto de un cDNA que codifica una proteína de fusión entera. Se conocen bien en la técnica una diversidad de técnicas de mutagénesis. Por ejemplo, un procedimiento de PCR mutagénico utiliza una extensión de superposición de cadenas para crear mutaciones de bases específicas con el propósito de cambiar una secuencia específica de aminoácidos en la proteína correspondiente. Esta mutagénesis por PCR requiere el uso

20 de cuatro cebadores, dos en la orientación delantera (cebadores A y C) y dos en la orientación inversa (cebadores B y D). Un gen mutado se amplifica a partir del molde de tipo natural en dos etapas diferentes.. La primera reacción amplifica el gen en mitades realizando una reacción de A a B y una reacción separada de C a D en la que los cebadores B y C dirigen el área del gen a mutar. Cuando se alinean estos cebadores

25 con el área diana, pueden contener disparidades en las bases dianas a cambiarse. Una

vez que las reacciones A a B y C a D se han completado, los productos de reacción se aíslan y se mezclan para uso como molde para la reacción A a D. Después esta reacción produce el producto completo mutado.

Una vez que se produce un gen que codifica la proteína de fusión entera se puede clonar en el vector adecuado de expresión. Las estrategias específicas que se pueden emplear para preparar las proteínas de fusión de GLP – 1 de la presente invención se describen en el ejemplo 1.

Procedimientos generales para expresar de forma recombinante las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención:

Las células huésped se transfectan o se transforman con vectores de expresión o clonación descritos en esta memoria descriptiva para la producción de proteína de fusión heteróloga y se cultivan en medio nutritivo convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares se pueden seleccionar por el experto en la técnica sin experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., más arriba. Los expertos en la técnica conocen los procedimientos de transfección, por ejemplo, CaPO_4 y electroporación. Los aspectos generales de las transformaciones del sistema huésped de células de mamíferos se han descrito en la patente de Estados Unidos N° 4.399.216. Típicamente las transformaciones en las levaduras se llevan a cabo según el procedimiento de van Solingen y col., *J. Bact.* 130 (2): 946 – 7 (1977) y Hsiao y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 76 (8): 3829 –

33 (1979). Sin embargo, se pueden usar otros procedimientos para introducir DNA en células, tales como microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policationes, por ejemplo polibreno o poliomitina. Para las diversas técnicas de transformación de células de mamíferos véase Kcown y
5 col., *Methods in Enzimology* 185: 527 – 37 (1990) y Mansour y col., *Nature* 336 (6197): 348 – 52 (1988).

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ácido nucleico (por ejemplo DNA) en los vectores de esta memoria descriptiva incluyen células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen pero no
10 se limitan a eubacterias, tales como los organismos Gram - negativos o Gram - positivos, por ejemplo, Enterobacteriáceas tales como *E. coli*. Están públicamente disponibles diversas cepas de *E. coli*, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 3 1.446); *E. coli* X1 776 (ATCC 3 1.537); *E. coli* cepa W3 110 (ATCC 27.325); y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procarióticas adecuadas incluyen
15 Enterobacteriáceas tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 4 1 P descrito en el documento DD226, 7 10, publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P.*
20 *aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es una célula huésped o huésped parental particularmente preferida porque es una cepa huésped común para fermentaciones de productos de DNA recombinantes. Preferiblemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3 110 se puede modificar para efectuar una
25 mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para la huésped,

ejemplos de tales células huésped incluyen *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo de *ronA*; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo de *tonA ptr3*, *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55, 244), que tiene el genotipo completo de *tonA, ptr3 phoA E15 (argF – lac) I69 degP ompT /can'*; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de supresión de *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene una proteasa periplásmica mutante descrita en la patente de Estados Unidos N° 4.946.783 expedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados los procedimientos *in vivo* de clonación, por ejemplo, PCR u otras reacciones con polimerasas de ácidos nucleicos.

- Además de los procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son adecuados huéspedes de clonación o expresión para vectores de proteínas de fusión. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior comúnmente usado. Otros eucariotas incluyen *Schizosaccharomyces pombe* [Beach y Nurse, *Nature* 290: 140 – 3 (1981); documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1995]; huéspedes *Muyveromyces* [patente de Estados Unidos N° 4.943.529; Fleer y col., *Bio / Technology* 9 (10): 968 – 75 (1991)] tales como por ejemplo *K. lactis* (MW98 – 8C, CBS683, CBS4574) [de Louvencourt y col., *J. Bacteriol.* 154 (2) : 737 – 42 (1983)]; *K. fragilis* (ATCC 12, 424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045) *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906) [Van den Berg y col., *Bio / Technology* 8 (2); 135 – 9 (1990)]; *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070) [Sreekrishna y col., *J. Basic Microbiol.* 28 (4). 265 – 278 (1988)]; *Candida Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* [Case y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 76 (10): 5259 – 63 (1979)]; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538

publicado el 31 de octubre de 1990), y hongos filamentosos tales como por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolipocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991) y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* [Ballance y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 112 (1): 284 – 9 (1983)]; Tilburn y col., *Gene* 26 (2 – 3): 205 – 21 (1983); Yelton y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 81 (5): 1470 – 4 (1984)] y *A. Niger* [Kelly y Hynes, documento EMBO J. 4 (2): 475 – 9 (1985)]. Levaduras metilotrópicas se seleccionan de los géneros constituidos por *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplares de esta clase de levaduras se puede encontrar en

10 C. Antony, *The Biochemistry of Methylotrophs* 269 (1982).

Células huésped adecuadas para la expresión de las proteínas de fusión de presente invención se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera sp*, *Spodoptera high5* así como células de plantas. Los ejemplos de líneas de células

15 huésped de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (abreviadamente CHO) y COS. Los ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS – 7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionaria humana [células 293 ó 293 subclonadas para crecimiento en cultivos en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.*, 36 (1): 59 – 74 (1977)]; células de ovario de

20 hámster chino / -DHFR [CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 77 (7): 4216 – 20 (1980)]; células de Sertoli de ratón [TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23 (1): 243 – 52 (1980)]; células de pulmón humano (W138. ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065) y tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL 51). La selección de la célula huésped se considera que está dentro de la

25 experiencia en la técnica.

Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden producir directamente por recombinación, o en forma de una proteína que tiene una secuencia de señal u otras secuencias adicionales que crean un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína de fusión madura. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del DNA que codifica la proteína de fusión que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp, o las guías de enterotoxina II termoestables. Para la secreción de la levadura la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, la guía de la invertasa de la levadura, guía de factor alfa (que incluye las guías del factor cc de *Saccharomyces* y las guías del factor cc de *Kluyveromyces*, las últimas están descritas en la patente de Estados Unidos N° 5.010.182) o la guía de fosfatasa ácida, la guía de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179), o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamíferos, se pueden usar las secuencias de señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tales como las secuencias de señal de los polipéptidos secretados de la misma o especies relativas así como guías secretoras virales.

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Tales secuencias se conocen bien para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación a partir del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram – negativas, el origen a partir del plásmido 2u es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

Los vectores de expresión y clonación típicamente contendrán un gen de

[Goeddel, *Nucleic Acids Res.* 8 (18): 4057 – 74 (1980); documento EP 36.776 publicado el 30 de septiembre de 1981] y promotores híbridos tales como el promotor tat [deBoer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 80 (1): 21 – 5 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine – Dalgarno
5 (abreviadamente S. D.) unida operativamente al DNA que codifica la proteína de fusión.

Los ejemplos de las secuencias promotoras adecuadas para uso con huésped de levaduras incluyen los promotores de 3 – fosfoglicceratoquinasa [Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.* 255 (24): 12073 – 80 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess, y col., *J. Adv Enzyme. Reg.* 7: 149 (1968); Holanda, *Biochemistry* 17 (23): 4900 – 7 (1978)], tales
10 como enolasa, gliceraldehído – 3 – fosfatodeshidrogenasa, hexoquinasa, piruvatodecarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa – 6 – fosfatoisomerasa, 3– fosfogliceratomutasa, piruvatoquinasa, triosafosfatoisomerasa, fosfoglucosaisomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles y que tienen la
15 ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento son las regiones de los promotores de la alcoholdehidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas catalíticas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído – 3- fosfatodeshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para el uso en la expresión
20 de levaduras son posteriormente descritos en el documento EP 73.657. La transcripción de mRNA que codifica proteínas de fusión a partir de vectores en células huésped de mamíferos se pueden controlar, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar,
25 citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y virus 40 de los simios

selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias autotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, los genes que codifican la D – alaninarracemasa de Bacilos.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados de células de mamíferos son los que permiten la identificación de la células competentes para recoger el ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión, tales como DHFR o timidinaquinasa.

10 Cuando se emplea DHFR de tipo natural una célula huésped adecuada es la línea celular CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada como se describe en [Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 77 (7): 4216 – 20 (1980)]. Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levaduras [Stinchcomb y col., *Nature* 282 (5734): 39 – 43 (1979); Kingsman

15 y col., *Gene* 7 (2): 141 – 52 (1979); Tschumper y col., *Gene* 10 (2): 157 – 66 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levaduras que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEPC1 [Jones *Genetics* 85: 23 – 33 (1977)].

Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor

20 operativamente unido a la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión para dirigir la síntesis de mRNA. Se conocen bien los promotores reconocidos por una diversidad de células huésped potenciales. Los promotores adecuados para uso con huésped procarióticos incluyen los sistemas promotores de la β -lactamasa y lactosa [Chang y col., *Nature* 275 (5681): 617 – 24 (1978); Goeddel y col., *Nature* 281 (5732):

25 544 – 8 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor hacia arriba de triptófano

(abreviadamente SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina y a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

5 La transcripción de un polinucleótido que codifica una proteína de fusión mediante eucariotas superiores se puede incrementar insertando una secuencia de potenciación en el vector. Los potenciadores son elementos de DNA que actúan en cis, usualmente entre aproximadamente 10 y 300 bp (pares de bases), que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias de potenciadores se
10 conocen ahora a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, cetoproteína a e insulina). Sin embargo, típicamente, se usará un potenciador de un virus de células eucarióticas. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en la zona tardía del origen de la replicación (bp 100 – 270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en la zona tardía del origen de la replicación y potenciadores
15 de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar con el vector en la posición 5' ó 3' a la secuencia que codifica la proteína de fusión pero se localiza preferiblemente en una posición 5' del promotor.

 Los vectores de expresión usados en las células huésped eucarióticas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros
20 organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el mRNA. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones 5' y ocasionalmente 3' no traducidas de DNA o cDNA eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que
25 codifica la proteína de fusión.

Se pueden recuperar diversas formas de una proteína de fusión a partir del medio de cultivo o a partir de lisados de células huésped. Si está unida a la membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton – X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la
5 expresión de una proteína de fusión se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como en ciclo congelación - descongelación, sonicación, rupturamecánica o agentes de lisis celular.

Purificación de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención:

10 Una vez que las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención se han expresado en la célula huésped adecuada, los análogos se pueden aislar y purificar. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento sobre carboximetilcelulosa; filtración en gel como Sephadex G – 75; resina de intercambio aniónico tal como DEAE o mono – Q; intercambio catiónico tal
15 como CM o Mono – S; sefarsa proteína A para separar contaminantes tales como IgG; columnas de metal quelante para unir formas marcadas de epitopo del polipéptido; HPLC en fase inversa; cromatografía de enfoque; gel de sílice; precipitación con etanol; precipitación con sulfato amónico.

Se pueden emplear diversos procedimientos de purificación de proteínas y tales
20 procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83 – 9 (1990) y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer – Verlag, NY (1982). La (s) etapa (s) de purificación seleccionada (s) dependerá (n) de la naturaleza del procedimiento de producción utilizados y la proteína de fusión producida. Por ejemplo, las proteínas de fusión que
25 comprenden un fragmento Fc se pueden purificar eficazmente usando una matriz de

afinidad de proteína A o proteína G. Los tampones de pH bajo o alto se pueden usar para eluir la proteína de fusión de la matriz de afinidad. Las condiciones de elución suaves ayudarán a prevenir la desnaturalización irreversible de la proteína de fusión. También se pueden usar los tampones que contienen imidazol. El ejemplo 3 describe algunos protocolos de purificación exitosos para las proteínas de fusión de la presente invención.

Caracterización de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención:

Existen numerosos procedimientos para caracterizar las proteínas de fusión de la presente invención. Algunos de estos procedimientos incluyen: electroforesis en dodecil sulfato sódico - gel de poliacrilamida (abreviadamente SDS - PAGE) unida a procedimientos de tinción de proteínas o inmunotransferencia que usa anticuerpos anti - IgG o anti - HSA. Otros procedimientos incluyen espectrometría de masas con ionización por desorción mediante láser asistida por matriz (abreviadamente MALDI - MS), cromatografía líquida / espectrometría de masas, electroénfoque isoelectrico, intercambio aniónico analítico, cromatoénfoque y dicroísmo circular por nombrar unos pocos. Un número representativo de proteínas de fusión heterólogas se caracterizaron usando SDS - PAGE unido con inmunotransferencia así como espectrometría de masas (véanse los ejemplos 4 y 5 y las figuras 3 y 4).

Por ejemplo la tabla 3 (véase el ejemplo 5) ilustra la masa molecular calculada de un número representativo de proteínas de fusión así como la masa determinada por espectrometría de masas. Además, las figuras 3 y 4 ilustran los pesos moleculares de un número representativo de proteínas de fusión determinados por SDS PAGE. Todas las proteínas de fusión heterólogas ensayadas se expresaron y se secretaron transitoriamente. Además, la secuencia de señal Igk se escindió para producir proteínas

con el extremo N terminal correcto.

Además, la tabla 3 muestra que en algunos casos la masa determinada por espectrometría de masas es mayor que la esperada. Esto es el resultado de la glicosilación de la porción Fc y la ampliación del extremo C terminal. La digestión 5 enzimática de las proteínas de fusión seguida de HPLC en fase inversa y espectrometría de masas pueden identificar las fracciones de péptidos que contienen restos de azúcar. Después estas fracciones de aminoácidos se pueden secuenciar por el aminoácido del extremo N terminal para identificar la posición de glicosilación potencial. Por ejemplo, la caracterización de exendina - 4 - Fc (SEC ID N° 29) muestra que la serina en la 10 posición 39 y la treonina en la posición 50 están glicosadas en el enlace en O y la asparagina en la posición 122 está glicosada en el enlace en N.

También se ensayaron un número representativo de proteínas de fusión de GLP - 1 para determinar su actividad. Existen numerosos procedimientos para detectar la actividad GLP - 1 *in vitro* e *in vivo* (véanse los ejemplos 6, 7, 8 y 9). La tabla 4 15 (ejemplo 6) ilustra la actividad del receptor de GLP - 1 asociada con diversas fusiones de GLP - 1. Los números son relativos a la actividad asociada con Val⁸ - GLP - 1 (7 - 37) OH. Todas las proteínas de fusión ensayadas tenían actividad de receptor de GLP - 1. Un nivel bajo de actividad *in vitro* no es necesariamente indicativo de un efecto débil *in vivo*. Debido al incremento sustancial de la semivida de estas proteínas de fusión, una 20 actividad débil *in vitro* generalmente no predice una débil actividad *in vivo*. La figura 7 y el ejemplo 7 ilustran la semivida prolongada asociada con las proteínas de fusión de la presente invención. Por ejemplo, Val⁸ - GLP-1 - Fc tiene una semivida de aproximadamente 45 horas en monos, Val⁸ - GLP-1 - HSA tenía una semivida de aproximadamente 87 horas en monos, Gly⁸ - Glu²² - GLP - 1 - CEx - engarce - IgG1 25 tenía una semivida después de la administración IV intravenosa de aproximadamente 55

horas en perros y Gly⁸ – Glu²² – GLP - 1 – CEx – engarce – IgG1 tenía una semivida después de administración SC (subcutánea) de aproximadamente 38 horas en perros.

Composiciones de la invención

5 La estabilidad física es también una característica esencial para la formulación de las proteínas terapéuticas. Los compuestos GLP – 1 han sido especialmente difíciles de fabricar y formular debido a los cambios estructurales que se presentan durante la elaboración. Por ejemplo, algunos compuestos GLP – 1 tienen una tendencia general a agregarse. Además, se ha demostrado que algunos compuestos GLP - 1 pasan de una
10 forma hélice α soluble y activa a una forma de hoja β insoluble y potencialmente inactiva. La fusión de los compuestos GLP – 1 a proteínas mayores tales como la región Fc de una IgG o albúmina no solamente actúa para aumentar la semivida del compuesto de GLP – 1, sino que también contribuye a la estabilidad física y conformacional de compuesto GLP -1. Por ejemplo, Val⁸ – GLP - 1 – engarce – HSA en PBS es estable a
15 37°C hasta aproximadamente 30 días.

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención se pueden formular con uno o más excipientes. Las proteínas de fusión activas de la presente invención se pueden combinar con un tampón farmacéuticamente aceptable y el pH se ajusta para proporcionar una estabilidad aceptable, y un pH aceptable para la administración tal
20 como administración parenteral.

Opcionalmente, se pueden añadir uno o más agentes antimicrobianos farmacéuticamente aceptables. Los agentes preferidos farmacéuticamente aceptables son metacresol y fenol. Se pueden añadir una o más sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la intensidad iónica o tonicidad. Se pueden añadir uno o más excipientes
25 para ajustar adicionalmente la isotonicidad de la formulación. La glicerina es un

ejemplo de un excipiente de ajuste de isotonicidad. Farmacéuticamente aceptable significa adecuado para administración a un ser humano u otro animal y por lo tanto, no contiene elementos tóxicos o contaminantes indeseables y no interfiere con la actividad de los compuestos activos de esta memoria descriptiva.

- 5 Una forma de sal farmacéuticamente aceptable de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención se pueden usar en la presente invención. Los ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición de ácido son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido *p*-toluensulfónico, ácido metanosufónico, ácido oxálico, ácido *p*-bromofenilsulfónico, 10 ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares.

Las sales de adición de ácido preferidas son las formadas con ácidos minerales tales como ácido clorhídrico y ácido bromhídrico.

- 15 Las sales de adición de base incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tales como hidróxidos de amonio o de metal alcalino o alcalinotérreo, carbonatos, bicarbonatos y similares. Tales bases útiles para preparar las sales de esta invención de este modo incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido amónico, carbonato potásico y similares.

20

Administración de composiciones:

La administración puede ser mediante cualquier vía que se sepa que es eficaz según el médico experto habitual. Uno de tales procedimientos es el periférico, vía parental. Comúnmente en la bibliografía médica se entiende la administración

- 25 parenteral como la inyección de una forma de dosificación en el cuerpo mediante una

jeringa estéril o algún otro dispositivo mecánico tal como una bomba de infusión. Las vías parenterales periféricas pueden incluir las vías de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden ser también
5 susceptibles de administración por vía oral, rectal, nasal o respiratoria inferior, que son vías no parenterales. De estas vías no parenterales, se prefieren la vía respiratoria inferior y la vía oral.

Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden usar para tratar un amplia diversidad de enfermedades y afecciones. Las proteínas de fusión de la presente
10 invención ejercen principalmente sus efectos biológicos actuando en un receptor denominado el "receptor de GLP - 1". De esta manera, los sujetos con enfermedades y/o afecciones que responden favorablemente a la estimulación del receptor de GLP - 1 o a la administración de los compuestos de GLP - 1 pueden tratarse con las proteínas de fusión de GLP - 1 de la presente invención. Se dice que estos sujetos "están en
15 necesidad de tratamiento con compuestos de GLP - 1" o "en necesidad de estimulación del receptor de GLP - 1". Se incluyen los sujetos con diabetes no insulino dependiente, diabetes insulino dependiente, accidente cerebro vascular (véase el documento WO 00/16797), infarto de miocardio (véase documento WO 98/08531), obesidad (véase el documento WO 98/19698), cambios catabólicos después de cirugía (véase la patente de
20 Estados Unidos Nº 6.006.753), dispepsia funcional y síndrome de intestino irritable (véase el documento WO 99/64060). También se incluyen los sujetos que requieren tratamiento profiláctico con un compuesto GLP - 1, por ejemplo, sujetos con riesgo de desarrollar diabetes no insulino dependiente (véase el documento WO 00/07617). Los sujetos con tolerancia alterada a la glucosa o alteración de la glucosa en ayunas, sujetos
25 cuyo peso corporal es aproximadamente un 25% superior al peso corporal normal para

la altura del sujeto y estructura corporal, los sujetos con pancrcatectomía parcial, sujetos que tienen uno o los dos padres con diabetes no insulino dependiente, sujetos que han tenido diabetes gestacional y sujetos que han tenido pancrcalitis aguda o crónica están en riesgo de desarrollar diabetes no insulino dependiente.

- 5 Una "cantidad eficaz" de un compuesto GLP – 1 es la cantidad que da como resultado un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado sin causar efectos secundarios inaceptables cuando se administra a un sujeto en necesidad de estimulación del receptor de GLP – 1. Un "efecto terapéutico deseado" incluye uno o más de lo siguiente: 1) una
- 10 mejoría de (1) los síntoma (s) asociada con la enfermedad o afección; 2) un retraso en el comienzo de los síntomas asociado con la enfermedad o afección; 3) un incremento de longevidad comparado con la ausencia del tratamiento; y 4) mayor calidad de vida comparada con la ausencia del tratamiento. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" de un compuesto GLP – 1 para el tratamiento de la diabetes es la cantidad daría como
- 15 resultado en un mayor control de la concentración de glucosa en sangre que en ausencia de tratamiento, con lo cual daría como resultado un retraso del comienzo de las complicaciones diabéticas tales como retinopatía, neuropatía o enfermedad de riñón. Una "cantidad eficaz" de un compuesto GLP – 1 para la prevención de diabetes es la cantidad que demoraría, comparada con la ausencia de tratamiento, el comienzo de los niveles elevados de glucosa en sangre que requiere tratamiento con fármacos
- 20 antihipoglucémicos tales como sulfonilureas, tiazolidindionas, insulina y/o bisguanidinas.

- La dosis eficaz de proteína de fusión para normalizar los niveles de glucosa en sangre de un paciente dependerá de un número de factores, entre los cuales se incluyen, sin limitación, el sexo del sujeto, su peso y edad, la gravedad de la incapacidad para
- 25 regular los niveles de glucosa en sangre, la vía de administración y la biodisponibilidad,

el perfil farmacocinético de la proteína de fusión, la potencia (% de ingrediente activo) y la formulación.

La presente invención comprende los compuestos de GLP - 1 que han mejorado las propiedades bioquímicas y biofísicas por medio de la fusión a una proteína de albúmina, un fragmento de albúmina, un análogo de albúmina, una proteína Fc, un fragmento Fc, o un análogo de Fc. Estas proteínas heterólogas se pueden expresar con éxito en células huésped, actividades de señalización mantenidas asociadas con la activación del receptor de GLP - 1, y tienen semividas prolongadas.

Los siguientes ejemplos se presentan para describir adicionalmente la invención.

El alcance de la presente invención no está construida de manera que esté solamente constituida por los siguientes ejemplos. Los expertos en la técnica reconocerán que los reactivos particulares, equipos y procedimientos descritos son meramente ilustrativos y no tienen la intención de limitar la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Construcción de DNA que codifica proteínas de fusión heterólogas

Ejemplo 1a Construcción de DNA que codifica Val⁸ - GLP -1 - (7 - 37) - Fc: Se aisló una porción de Fc de IgG1 humana de una genoteca de cDNA y contiene la región flexible completa y los dominios de CH₂ y CH₃. Un fragmento que contenía 696 pares de bases de esta porción Fc de IgG1 humana se subclonó en las posiciones *NheI* y *Eco47III* del vector de expresión de mamíferos pJB02 para crear pJB02 / Fc (véase figura 5). Se generó DNA que codifica la secuencia de señal de secreción de Igx condensada con Val⁸ - GLP - 1 (7 - 37) mediante hibridación *in vitro* de cuatro oligonucleótidos de superposición y complementarios:

5' - CTAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTT
CCAGGTTCCACTGGTGACCAGTG - 3' [SEC ID N° 12]

5' - GAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCTCCTATCTGGAGGGCCAGGCCGCCAAGGA
GTTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGAAGAGGC - 3' SEC ID N° 13

5' - TGAAGGTGCCCTCCACGTGGTCACCAGTGGAACCTGGAACCCAGAGCAGCAGTA
CCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCATGGTGG - 3' SEC ID N° 14

5' - GCCTCTTCCCTTCACCAGCCAGGCGATGAACTCCTTGGCGGCCTGGCCCTCCAGA
TAGGAGGACACGTCCGAGG - 3' SEC ID N° 15

La reacción de hibridación se llevó a cabo utilizando cantidades equivalentes de cada oligonucleótido (1 pm/μl de concentración final para cada oligo). La mezcla de oligonucleótidos se calentó durante 5 minutos a 100°C en tampón de ligación (Tris –
5 HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1mM , albúmina sérica bovina 25 μg/ml) y después se enfrió durante al menos 2 horas a 30°C.

El producto de hibridación resultante se ligó durante 2 horas a temperatura ambiente o durante una noche a 16°C a la estructura del vector pJB02 /Fc que se había digerido con *NheI* y *Eco47III*. Los productos de ligación se utilizaron para transformar
10 células XL 1 Blue competentes (Stratagene). Se analizaron los plásmidos recombinantes para detectar la presencia de inserciones que codifican péptidos mediante la digestión de clones con *NcoI* (que codifica la secuencia Kozak y la Met primera del péptido de señal) y se secuenció. El plásmido de expresión resultante usado para ensayos de transfección se denominó pJB02 – V8 – GLP -1 – Fc (figura 5).

15

Ejemplo 1 b Construcción de DNA que codifica Val⁸ – GLP – 1 (7 – 37) – HSA: Se

compró el plásmido HSA/pcDNA3.1GS en Invitrogen (nº de catálogo H – M12523M – pcDNA3.1/GS) y se utilizó como molde para aislar el cDNA que codifica albúmina sérica humana (abreviadamente HSA). El cDNA de HSA se preparó usando PCR en la que el DNA que codifica la secuencia guía así como el pro – péptido de seis
 5 aminoácidos se retiraron del extremo 5'. Además, se añadieron codones de parada directamente en el extremo 3' de la secuencia que codifica HSA. Finalmente, las posiciones de la enzima de restricción se modificaron genéticamente en los extremos 5' y 3' para facilitar la clonación. La secuencia DNA de HSA presente en el vector original comprada en Invitrogen contenía un cambio en una base en la región 3' del gen
 10 (posición 667) en comparación con la secuencia humana nativa. Este cambio daría como resultado un codón para Asn en lugar de Asp. De este modo, usando el procedimiento de mutagénesis mediante PCR de superposición de cadena descrito anteriormente, el codón se cambió para codificar para Asp en esta posición. El DNA resultante que codifica HSA se clonó en las posiciones *NheI* e *Hind III* de pJB02 para
 15 crear pJB02 – HSA (figura 6).

La secuencia guía de Igκ condensada con la secuencia Val⁸ – GLP – 1 (7 – 37) se generó como se describe en el ejemplo 1a. Este DNA se ligó en las posiciones *NheI* y *FspI* de pJB02 – HSA para crear pJB02 - Val⁸ – GLP – 1 – HSA.

Ejemplo 1 c Construcción de DNA que codifica Val⁸ – GLP – 1 (7 – 37) –
 20 engarce – HSA:

El vector pJB02 – HSA se preparó como se ha descrito en ejemplo 1b. El DNA que codifica la secuencia del engarce [GGGGS]₃ se ligó en fase al extremo 5' del DNA que codifica HSA para crear pJB02 – engarce – HSA (figura 7). El DNA que codifica la secuencia guía de Igκ condensada con la secuencia Val⁸ – GLP – 1 (7 – 37) y la parte 5'
 25 de la secuencia del engarce se generó como se describe en el ejemplo 1a. Este DNA se

29
529

ligó en las posiciones *NheI* y *BspEI* de pJB02 para crear pJB02 - Val⁸ - GLP - 1 -
engarce - HSA.

Ejemplo 1d Construcción de DNA que codifica exendina - 4 - Fc.

5 El plásmido pJB02 / Fc se preparó como se ha descrito en el ejemplo 1a. El
DNA que codifica la secuencia de señal de Igκ condensada a la exendina - 4 se generó
mediante hibridación *in vitro* de los siguientes oligonucleótidos de superposición y
complementarios:

5' - CTAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACCGGTCAC - 3' [SEC ID N° 16]

5' - GGAGAGGGAACCTTCACCAGCGACCTGAGCAAGCAGATGGAGGAGGAGGCCGT
GAGACTG - 3' [SEC ID N° 17]

5' - TTCATCGAGTGGCTGAAGAACGGAGGACCAAGCAGCGGAGCCCCCTCCTCCT
AGC - 3' [SEC ID N° 18]

5' - GAACCTGGAACCCAGAGCAGCAGTACCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCA
TGGTGG - 3' [SEC ID N° 19]

5' - CTCCTCCTCCATCTGCTTGCTCAGGTCGCTGGTGAAGGTTCCCTCTCCGTGA
CCGGTG - 3' [SEC ID N° 20]

10

5' - GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTTGGTCCTCCGTTCTTCAGCCACTCGAT
GAACAGTCTCACGGC - 3' [SEC ID N° 21]

La reacción de hibridación se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1a. El producto hibridado se ligó al vector pJB02 que se había digerido con *NheI* y *Eco47III* como se ha descrito en el ejemplo 1a para crear pJB02 – exendina – 4 – Fc.

5

Ejemplo 1e Construcción de DNA que codifica exendina – 4 – HSA:

El plásmido pJB02 / HSA se preparó como se ha descrito en el ejemplo 1b. El DNA que codifica la secuencia de señal de Igκ condensada a la exendina – 4 se generó
10 mediante hibridación *in vitro* de los mismos oligonucleótidos de superposición y complementarios descritos en el ejemplo 1d. Las reacciones de hibridación también se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente. El DNA se clonó en posiciones únicas *NheI* y *FspI* en pJB02 – HSA para crear pJB02 – exendina – 4 – HSA.

15

Ejemplo 1f Construcción de DNA que codifica exendina – 4 – engarce – HSA:

El plásmido pJB02 – engarce - HSA se construyó como se ha descrito en el ejemplo 1c. El DNA que codifica la secuencia de señal de Igκ condensada con la exendina – 4 y la parte 5' de la secuencia del engarce se generó como en el ejemplo 1d. Este DNA se clonó en posiciones únicas *NheI* y *BspEI* en pJB02 – engarce - HSA para
20 crear pJB02 – exendina – 4 – engarce - HSA.

Ejemplo 1g Construcción de DNA que codifica Val⁸ – GLP – 1 / C – Ex - Fc:

El plásmido pJB02 – exendina 4 - Fc se preparó como se ha descrito en el ejemplo 1d. El DNA que codifica exendina – 4 se escindió del vector con *AgeI* y
25 *Eco47III*. El DNA que codifica Val⁸ – GLP – 1 / C – Ex se generó mediante hibridación

in vitro de los siguiente oligonucleótidos de superposición y complementarios:

5' -CCGGTCACGTGGAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTGGA
GGGCCAGGCCGCCA - 3' [SEC ID N° 22]

5' - AGGAATTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGCAGCAGCGG
AGCCCCCTCCTCCTAGC - 3' [SEC ID N° 23]

5' - CTCCAGATAGGAGGACACGTCGGAGGTGAAGGTGCCCTCCAC
GTGA - 3' [SEC ID N° 24]

5' - GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTGCCCCGGCCCTTCACCAGCCAGGCGA
TGAATTCCTTGGCGGCCTGGCC - 3' [SEC ID N° 25]

- 5 La reacción de hibridación se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1a. El producto hibridado se ligó en lugar de exendina - 4 en el vector de expresión pJB02 - exendina - 4 - Fc para crear pJB02 - Val⁸ - GLP - 1 / C - Ex - Fc.

Ejemplo 1h Construcción de DNA que codifica Val⁸ - Glu²² - GLP - 1 - Fc:

- 10 El plásmido pJB02 - exendina 4 - Fc se preparó como se ha descrito en el ejemplo 1d. El DNA que codifica exendina - 4 se escindió del vector con *AgeI* y *Eco47III*. El DNA que codifica Val⁸ - Glu²² - GLP - 1 se generó mediante hibridación *in vitro* de los siguiente oligonucleótidos de superposición y complementarios:

5' -CCGGTCACGTGGAGGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTCGA
GGAGCAGGCCGCCA - 3' [SEC ID N° 26]

5' - AGGAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGC - 3' [SEC ID N° 27]

5' - GCCCCGGCCCTTCACCAGCCAGGCGATGAACTCCTTGGCGGCC
TGCTC - 3' [SEC ID N° 28]

5' - CTCGAGATAGGAGGACACGTCCGAGGTGAAGGTGCCCT
CCACGTGA - 3' [SEC ID N° 29]

La reacción de hibridación se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1a.

El producto hibridado se ligó en lugar de exendina - 4 en el vector de expresión pJB02 - exendina - 4 - Fc para crear pJB02 - Val⁸ - Glu²² - GLP - 1 - Fc.

5

Ejemplo 1i Construcción de DNA que codifica Val⁸ - Glu²² - GLP - 1 / C - Ex - Fc:

El plásmido pJB02 - exendina 4 - Fc se preparó como se ha descrito en el ejemplo 1d. El DNA que codifica exendina - 4 se escindió del vector con *AgeI* y *Eco47III*. El DNA que codifica Val⁸ - Glu²² - GLP - 1 / C - Ex se generó mediante
10 hibridación *in vitro* de los siguiente oligonucleótidos de superposición y complementarios:

5' - CCGGTCACGTGGAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTCGA
GGAGCAGGCCGCCA - 3' [SEC ID N° 30]

5' - AGGAATTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGCAGCAGCGGA
GCCCCTCCTCCTAGC - 3' [SEC ID N° 31]

5' - CTCGAGATAGGAGGACACGTCGGAGGTGAAGGTGCCC
TCCACGTGA - 3' [SEC ID N° 32]

5' - GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTGCCCCGGCCCTTCACCAGCCAGGCCGA
TGAATTCCTTGGCGGCCTGCTC - 3' [SEC ID N° 33]

La reacción de hibridación se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1a. El producto hibridado se ligó en lugar de exendina - 4 en el vector de expresión pJB02 - exendina - 4 - Fc para crear pJB02 - Val⁸ - Glu²² - GLP - 1 / C - Ex - Fc.

5

Ejemplo 1j Construcción de DNA que codifica Gly⁸ - GLP - 1 - Fc:

El plásmido pJB02 - exendina 4 - Fc se preparó como se ha descrito en el ejemplo 1d. El DNA que codifica exendina - 4 se escindió del vector con *AgeI* y *Eco47III*. El DNA que codifica Gly⁸ - GLP - 1 se generó mediante hibridación *in vitro*

10 de los siguiente oligonucleótidos de superposición y complementarios:

5' - CCGGTCACGGCGAGGGCACCTTCACTAGTGACGTGTCCTCCTATCTGGA
GGGCCAGCCGCCA - 3' [SEC ID N° 34]

5' - AGGAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGC - 3' [SEC ID N° 35]

5' - CTCCAGATAGGAGGACACGTCACTAGTGAAGGTGCCCTC
GCCGTGA - 3' [SEC ID N° 36]

5' - GCCCCGGCCCTTCACCAGCCAGGCGATGAACTCCTTGGCGGC
CTGGCC - 3' [SEC ID N° 37]

La reacción de hibridación se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1a.
El producto hibridado se ligó en lugar de exendina - 4 en el vector de expresión pJB02
5 - exendina - 4 - Fc para crear pJB02 - Gly⁸ - GLP -1 - Fc.

Ejemplo 2: Expresión de proteínas de fusión heterólogas

La expresión de las proteínas de fusión codificadas por las construcciones del
DNA del ejemplo 1 se llevó a cabo mediante transfección transitoria de células HEK
10 293EBNA (tanto adherentes como en suspensión). Las células se contaron y se
sembraron 24 horas antes de la transfección. El cóctel de transfección se preparó
mezclando el reactivo de transfección FuGene™6 (Roche Molecular Biochemicals, N°
de catálogo 1814443) con OptiMEM (Gibco/BRL) y se incubaron a temperatura
ambiente durante 5 minutos momento en el cual se añadió DNA y el cóctel se incubó
15 durante un tiempo adicional de 15 minutos. Inmediatamente antes de la transfección se
añadió medio de cultivo recién preparado a la placa. Las tablas 1 y 2 proporcionan
detalles de la transfección adicionales.

85
535

Tabla 1: Los reactivos usados en las transfecciones transitorias de células 293 EBNA.

Recipiente de cultivo de tejidos	Número de células sembradas	DNA (µg)	FuGene (µl)	Medio OptiMEM (ml)	Vol. De medio de cultivo (ml)
35 mm	5 x 10 ⁵	1,5	9	0,102	2
100 mm	2 x 10 ⁶	12	73	0,820	10
700 cm ² (BC)	2 x 10 ⁷	65	400	4,0	100

Tabla 2: Composición de los medios

MEDIO DE TRANSFECCIÓN Y CULTIVO	MEDIO DE RECOLECCIÓN
3:1 de DMEM F12	Base de Hybritech
FBS al 5%	Ca ²⁺ 1 mM
HEPES 20 mM	HEPES 20 mM
L – glutamina 2 mM	Nuselina (insulina humana) 1 µg/ml
Geneticina(G418 NEO) 50 µg/ml	Transferrina humana 1 µg/ml
Trobomicina 50 µg/ml	Trobomicina 50 µg/ml

5

Para transfecciones a pequeña escala (recipientes de 35 mm – 100 mm), se aclararon células con PBS y se cambiaron al medio de recogida 24 horas después de la transfección y se recogió el medio y se sustituyó cada 24 horas durante varios días. En el caso de transfecciones a gran escala (botellas cilíndricas de 700 cm²), las botellas

cilíndricas se aclararon con PBS 48 horas después de la transfección y se cambiaron al medio de recogida. Los medios se recogieron y se cambiaron cada 24 horas durante al menos 10 días consecutivos. Rutinariamente, solamente se usaron 10 recogidas para la purificación posterior de proteínas.

5 Ejemplo 3: Purificación de proteínas de fusión heterólogas

Ejemplo 3a purificación de Val⁸ – GLP – 1 – Fc

Se filtraron aproximadamente 4,5 litros de medio acondicionado (aproximadamente 20 µg/ml de nivel de expresión de proteínas de fusión) de transfecciones a gran escala utilizando un sistema de filtro CUNO y se concentraron
10 hasta 250 ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial Proflux con un filtro de membrana 10K. Se capturó Val⁸ – GLP – 1 – Fc con una columna de 5 ml de proteína A HiTrap en PBS 1 x, pH 7,4 a un caudal de 2 ml/min y se eluyó con ácido cítrico 50 mM pH 3,3. Las fracciones (1ml) se recogieron en tubos que contenían 4 ml PBS 1 x y 100 µl de Tris 1 M pH 8.

15 Las fracciones que contenían la proteína de fusión según se determinó mediante SDS – PAGE y HPLC de fase inversa en Zorbax C8, se combinaron y se aplicaron a una columna Superdex 75 60/60 en PBS 1 x, pH 7,4 y a un caudal de 10 ml/min. Las fracciones positivas (20 ml/tubo) se recogieron y se combinaron. Después las fracciones combinadas se sometieron a cromatografía en fase inversa C4 en TFA al 0,1% a un
20 caudal de 3 ml/min. Se eluyó Val⁸ – GLP – 1 – Fc usando un gradiente desde 5% de B (TFA al 0,1% en acetonitrilo) hasta 100% de B en 70 minutos. Se recogieron las fracciones eluyentes (3 ml/tubo). Se retiró el acetonitrilo mediante secado a vacío y se añadió 1 ml de H₂O. La muestra purificada (aproximadamente 32 ml) se dializó dos veces frente a 4 litros de PBS 1x pH 7,4.

25 Después se filtró la muestra dializada usando un filtro de 0,22 µm MILLEX –

GV y se determinó la concentración usando absorción a 280 nm.

Ejemplo 3b purificación de Val⁸ – GLP – 1 – HSA o Val⁸ – GLP – 1 – engarce – HSA

5 Se filtraron aproximadamente 6,5 litros de medio acondicionado (aproximadamente 10 µg/ml de nivel de expresión de proteínas de fusión) utilizando un sistema de filtro CUNO y se concentraron hasta 380 ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial Proflux con filtro de membrana 10K.

La proteína de fusión se capturó con una columna Q de 50 ml de flujo rápido
10 (Pharmacia) en Tris 20mM, pH 7,4 a un caudal de 5 ml/min. La proteína se eluyó usando un gradiente: desde 0% a 50% de Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 1M en 10 CV, después hasta 100% de B en 2CV

Las fracciones que contenían la proteína de fusión se combinaron y se sometieron a una cromatografía en fase inversa C4 en TFA al 0,1% en agua a un caudal
15 de 5 ml/min. La proteína de fusión se eluyó usando un gradiente de 20% de B (TFA al 0,1% en acetonitrilo) hasta 90% de B en 120 minutos. Se recogieron las fracciones (3,5 ml/tubo). Se retiró el acetonitrilo mediante secado a vacío.

Se diluyeron aproximadamente 9 ml de muestra combinada con PBS 1 x pH 7,4 hasta 40 ml y se dializó frente a 4 litros de PBS 1x pH 7,4 durante una noche. Se filtró
20 la muestra y se determinó la concentración usando absorción a 280 nm.

Ejemplo 3c purificación de Exendina – 4 – Fc:

Se filtraron aproximadamente 4 litros de medio acondicionado (aproximadamente 8 µg/ml de nivel de expresión de proteínas de fusión) utilizando un
25 sistema de filtro CUNO y se concentraron hasta 250 ml usando un sistema de filtración

de flujo tangencial Proflux con filtro de membrana 30K.

La exendina – 4 Fc se capturó con una columna de 5 ml de proteína A HiTrap en PBS 1 x, pH 7,4 a un caudal de 2 ml/min y se eluyó con ácido cítrico 50 mM pH 3,3. Las fracciones que contenían la proteína de fusión se combinaron, se filtraron y se
5 dializaron frente a 4 litros de PBS 1 x durante una noche. Después la muestra dializada se aplicó a una columna Superdex 75 60/60 en PBS 1 x, pH 7,4, NaCl 0,5 M a un caudal de 10 ml/min. Las fracciones (20 ml/tubo) que contenían la proteína de fusión se recogieron, se combinaron y se concentraron hasta aproximadamente 1 mg/ml.

Después se filtraron las muestras concentradas usando un filtro de 0,22 µm
10 MILLEX – GV.

Ejemplo 3d purificación de Exendina – 4 – HSA y exendina – 4 – engarce - HSA:

Se filtraron aproximadamente 1,1 litros de medio acondicionado (aproximadamente 6 µg/ml de nivel de expresión de proteínas de fusión) utilizando un
15 sistema de filtro CUNO y se concentraron hasta 175 ml usando un sistema de filtración de flujo tangencial Proflux con filtro de membrana 30K.

La proteína de fusión se capturó usando una columna de 5 ml de HiTrap Q – sefarosa (Pharmacia) en Tris 20 mM, pH 7,4 a un caudal de 2 ml/min. La proteína se eluyó usando un gradiente desde 0% hasta 50% de Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 1 M en 12
20 CV y después hasta 100% de B en 4 CV.

Las fracciones que contenían la proteína de fusión se combinaron y se sometieron a cromatografía en fase inversa C4 en TFA al 0,1% en agua a un caudal de 5 ml/min. Se eluyó la proteína de fusión usando un gradiente desde 10% de B (TFA al 0,1% en acetonitrilo) hasta 100% de B en 70 minutos. Se recogieron las fracciones (10
25 ml/tubo) que contenían la proteína de fusión. Se retiró el acetonitrilo usando un secador

a vacío.

Se dializaron aproximadamente 8 ml de muestra combinada frente a 4 litros de PBS 1 x, pH 7,4 durante una noche. Se filtró la muestra y se determinó la concentración mediante absorción a 280 nm. Después la muestra dializada se aplicó a una columna
5 Superdex 200 26/60 en PBS 1 x, pH 7,4, NaCl 0,5 M a un caudal de 2 ml/min. Las fracciones (3 ml/tubo) que contenían la proteína de fusión se recogieron, se combinaron, se concentraron y se filtraron.

Ejemplo 4: Caracterización de las proteínas de fusión mediante SDS PAGE:

SDS – PAGE seguida de inmunotransferencia se utilizó para analizar tanto la
10 proteína de fusión purificada como el medio acondicionado de las células transfectadas con diversos vectores de expresión de proteínas de fusión. La SDS - PAGE se realizó en un sistema Novex Powereasa 500 que usa geles Precast de Tris-Glicina al 16% Novex (EC6498), tampón de desarrollo (10x, LC2675) y tampón de muestra (L2676). Se redujeron las muestras con DTT 50 mM y se calentaron durante 3 – 5 minutos a 95°C
15 antes de la carga.

Después de desarrollar el gel SDS – PAGE, se utilizaron agua y tampón de transferencia (1x Tris – glicina Seprabuff (Owl Scientific N° de Cat. ER26 – S) con metanol al 20%) para lavar el SDS de los geles. Se utilizó un aparato de transferencia Novex con PVDF (BioRad, N° de Cat. 162 – 0174) y membranas de nitrocelulosa
20 (Biorad, N° de Cat. 1703965 ó 1703932). La transferencia se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 90 minutos a 30 – 35 V. Se bloquearon las membranas en PBS 1X con Tween – 20 al 0,1% (Sigma, N° de Cat. P – 7949) y Leche 5% (BioRad, N° de Cat. 170 – 6404) durante 1 – 12 horas a 4°C. Se diluyen los anticuerpos en PBS 1X + Leche al 5% y se incuban las manchas detectadas en estas soluciones durante 1 – 2 horas a
25 4°C. Entre las incubaciones, se lavaron las manchas detectadas cuatro veces durante 5

minutos cada una con PBS 1X y Tween – 20 al 0,2% a temperatura ambiente. PBS se preparó o bien de PBS 10X GIBCO (Nº de Cat. 70011), para dar una composición final de fosfato monobásico de potasio 1 mM, fosfato dibásico de sodio 3 mM, cloruro sódico 153 mM, pH 7,4, o bien a partir de bolsas de PBS de Sigma (Nº de Cat. 1000 – 3), para dar NaCl 120 mM, KCl 2,7 mM y fosfato 10 mM, pH 7,4 a 25°C.

Los anticuerpos principales eran bien un anti – IgG1 de cabra monoclonal o anti – HSA de conejo. El anticuerpo secundario eran bien un anti IgG HRP de cabra o un anti IgG HRP de conejo. Se diluyó el anticuerpo secundario 1:5000. Se utilizó un sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Nº de Cat RN2108 y Nº de Cat RPN1674H) para revelar las manchas.

La figura 3A compara la proteína Fc purificada con medio acondicionado a partir de células transfectadas con pJB02 – Val⁸ – GLP -1 – Fc y pJB02 – exendina – 4 – Fc. La disminución en movilidad es coherente con el incremento de tamaño debido a la porción de GLP – 1 de la proteína de fusión. De manera similar la figura 3B compara HSA purificado con medio acondicionado a partir de células transfectadas con pJB02 – Val⁸ – GLP -2 – HSA, pJB02 – Val⁸ – GLP -1 – engarce – HSA, pJB02 – exendina – 4 – HSA, o pJB02 – exendina – 4 – engarce – HSA. La figura 4 identifica las preparaciones de proteínas de fusión purificadas.

20 Ejemplo 5: Caracterización de proteínas de fusión usando espectrometría de masas:

Todos los experimentos se realizaron en un espectrómetro de masas Micromass TofSpec – 2E equipado con electrónica de enfoque retardado, un Reflectron (usado en análisis de péptidos de intervalo 0 – 8000 Da), un detector lineal (usado durante análisis de alta masa / buena señal) y detector de post aceleración (o P. A. D., usado para análisis de alta masa / señal extremadamente baja). La longitud eficaz de recorrido del

instrumento en modo lineal es 1,2 metros, en el modo Reflectron es 2,3 metros. Se ajustaron dos detectores de placa de microcanal dual para el modo de detección lineal y reflectron. El láser usado es un láser de nitrógeno Laser Science Inc. VSL – 337i que funcionaba a 337 nm a 5 disparos de láser por segundo. Todos los datos adquiridos usando un digitalizador interno de 2 GHz, 8 bit y hasta 50 disparos de láser se promediaron por espectro.

El instrumento funcionó en modo lineal durante el análisis de las proteínas de fusión de GLP – 1 en cuestión. El detector lineal es un dispositivo que detecta iones que viajan por debajo del tubo de fuga del instrumento MALDI – ToF – MS. Mide la abundancia de iones durante el tiempo y envía una señal al digitalizador para conversión. El digitalizador es un convertidor de analógico-digital que permite que la señal del espectrómetro de masas se transfiera al ordenador, donde se reconstruye en un espectro m/z utilizable.

Se utilizó una solución de ácido sinapínico saturado recristalizado (diluido en 50/50 Acn / H₂O y TFA al 0,1%) como matriz de ionización. El ácido sinapínico es una matriz adecuada para las proteínas superiores a 10 kDa. Las proteínas de referencia de masa apropiada se usaron para perfiles de calibración internos y externos con el fin de obtener determinaciones de masas precisas en las muestras analizadas. Todas las muestras se analizaron usando una dilución 1:2 muestra a matriz de dilución. Inicialmente el instrumento se puso en marcha a las siguientes condiciones del detector lineal:

Tensión de fuente: 20,0 keV	Tensión de pulso: 3,0 keV
Tensión de extracción : 20,0 keV	Grueso de láser: 50
Tensión de enfoque: 16,0 keV	Finura de láser: 50

92
542

Detector lineal: 3,7 keV

P. A. D.: (desconectado)

Estos ajustes se modificaron (según necesidad) para dar la mejor relación señal / ruido y la más alta resolución. La tabla 3 proporciona una caracterización de las diferentes proteínas de fusión de GLP – 1.

Tabla 3

PROTEÍNA DE FUSIÓN	MASA ESPERADA (KDa)	MASA DETERMINADA POR ESPEC. DE MASAS (KDa)
Val ⁶ – GLP -1 – IgG1	59,08	61,94
Val ⁶ – Glu ²² – GLP -1 – IgG1	59,23	63,61
Gly ⁶ – GLP -1 – IgG1	59,00	62,93
Val ⁶ – GLP -1 – CEx - IgG1	60,45	65,1 – 65,6
Val ⁶ – Glu ²² – GLP -1 – CEx - IgG1	60,69	65,86
Exendina – 4 – IgG1	60,69	65,86
Val ⁶ - GLP -1 – engarce– HSA	70,70	69,89 – 70,74
Exendina – 4 – HSA	70,56	70,62
Exendina – 4 – engarce - HSA	71,56	71,62

CEx se refiere a una extensión del extremo C terminal y comprende la secuencia de

10 Ser – Ser – Gly – Ala – Pro – Pro – Pro – Ser.

El engarce es Gly – Gly – Gly – Gly – Ser – Gly – Gly – Gly – Gly – Ser – Gly – Gly – Gly – Gly – Ser.

Ejemplo 6: Actividad de las proteínas de fusión heterólogas:

La capacidad de las proteínas de fusión de la presente invención para activar el receptor de GLP – 1 se evaluó utilizando ensayos *in vitro* tales como los descritos en el documento EP 619.322 de Gelfand y col., y la patente de Estados Unidos N° 5.120.712 respectivamente. La actividad de estos compuestos relativa a la actividad de Val⁸ – GLP – 1 (7 – 37) OH se indica en la tabla 4. La figura 8 representa las curvas dosis respuesta *in vitro* de Val⁸ – GLP – 1 y proteínas de fusión de Exendina – 4. Además, las tablas 5a y 5b proporcionan la actividad *in vitro* de una gran cantidad de análogos de GLP – 1 que se pueden condensar con una proteína de Fc o de albúmina para elaborar las proteínas de fusión biológicamente activas. Estas actividades se comparan con GLP – 1 (7 – 37) OH.

Tablas 4: Actividad *in vitro* de proteínas de fusión de GLP – 1.

Proteína de fusión	Actividad <i>in vitro</i> (% de Val ⁸ - GLP - 1)
Val ⁸ - GLP - IgG1	1
exendina – 4 – IgG1	240
Val ⁸ - GLP - 1 – engarce – HSA	0,2
exendina – 4 – HSA	20
Exendina – 4 – engarce – HSA	90
exendina – 4	500
Val ⁸ – Glu ²² – GLP – 1 – IgG1	3,7
Gly ⁸ – GLP – 1 – IgG1	3,3
Val ⁸ – GLP – 1 – CEx - IgG1	3,3

94
544

Val ⁸ - Glu ²² - GLP - 1 - CEx - IgG1	29
Gly ⁸ - Glu ²² - GLP - 1 - C2 - IgG1	75
Gly ⁸ - Glu ²² - GLP - 1 - CEx - engarce - IgG1	150
exendina - 4 - C2 - IgG1	250
exendina - 4 - engarce - IgG1	330
Gly ⁸ - Glu ²² - GLP - 1 - CEx - engarce - HSA	4
Gly ⁸ - Glu ²² - GLP - 1 - CEx - engarce - IgG4	80

CEx se refiere a una extensión del extremo C terminal y comprende la secuencia de Ser - Ser - Gly - Ala - Pro - Pro - Pro - Ser.

El engarce es Gly - Gly - Gly - Gly - Ser - Gly - Gly - Gly - Gly - Ser - Gly - Gly -

5 Gly - Gly - Ser.

C2 es Ser - Ser - Gly - Ala - Ser - Ser - Gly - Ala.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión descritas en las tablas 3 y 4 se representan en las SEC ID N° 13 a SEC ID N° 31:

La secuencia de aminoácidos de Val⁸ - GLP 1 - albúmina sérica humana se
10 representa en la SEC ID N° 13.

1 HVEGTFSTSDV SSYLEGQAAK RFIAMLVKGR GDANKSEVAH RPKDLGKEENF KALVLIJAFQ
61 YLQQCPFEDH VKLVNEVTEF ARTCVADESA ENCDKSLHTL PGDKLCTVAT LRETYGENAD
121 CCANQEPERN ECFLQHKDDN PMLPRLVRPE VDMCTAFHD NEETFLKKYL YELARRHPYF
181 YAPELLFFAK RYKAAPTECC QAADKAACLL PKLDELDEG KASSAKQRLK CASLQKFGER
241 AFKAWAVARL SQRFPAEFA EVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADDRAD LAKYICENDQ
301 SISSKLKECC EKPILEKSHC IAEVENDEMP ADLPSLAADF VESKDVCNRY AEAKDVFLGN
361 FLYEYARRMP DYSVVLLRL ARTYETTLK CCAADPHEC YAKVFDEFKP LVEEPQNLK
421 QNCELFEQLG EYKQNALLV RYTKVPQVS TPTLVEVERN LGKVGSKCCK HPEAKRMPCA
481 EDYLSVVLNQ LCVLHEKTPV SDRVTKCTE SLVRRPCPS ALEVDETYVP KEFNAETTF
541 HADICTLSEK ERQIKQTAL VELVKHKPKA TKEQLKAVMD DFAAFVEKCC KADKETCFA
601 BEGKKLVAAS QAALGL [SEC ID N° 13]

La secuencia de aminoácidos de Val⁸ - GLP-1- engarce - albúmina sérica humana se representa en la SEC ID N° 14.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EPIANLVKGR GGGGSGGGG SGGGSDAHK SEVAHRFKDL
61 GEENFKALVL IAFAYLQQC PFEDHVKLVN EVTEFAKTCV ADESAENCCK SLHTLFGDKL
121 CTVAFLRETY GEMADCCAKQ EPERNECFLO HKDDNPNLPR LVRPEVDVMC TAFHNEETP
181 LKKYLYETAR RHPYFYAPEL LFFAKRYKAA FTECCQAADK AACLLPKLDE LRDEGKASSA
241 KQRLKASLQ KGERAFKAW AVARLSQRFP KAFAEVSKL VTDLTKVHTE CCHGDLLECA
301 DORADLAKYI CENQDSISSK LKECCCKPLL EKSHCIAEVE NDENPADLPS LAADFVESKO
361 VCKNYAEAKD VFLGMFLYFY ARRHFDYSVV LLLRLAKTYE TTLEKCCAAA DPHECYAKVF
421 DEFKPLVEEP QNLKQNCCL FEQLGEYKFO MALLVRYTKK VPQVSTPTLV EVERNLGKVG
481 SKCKHPEAK RMPCAEDYLS VVLNQLCVLH EKTFSVDRVT KCCTESLVNR PCPSALEVD
541 ETVVPKEFNA ETTFPHADIC TLSEKERQIK KQTALVELVK HKPKATKEQL KAVMDPFAAF
601 VEKCKRADDK ETCFAEBGKR LVAASQAALG L [SEC ID N° 14]

```

- 5 La secuencia de aminoácidos de Gly⁸ - Glu²² - GLP - 1- CEx - engarce - albúmina sérica humana se representa en la SEC ID N° 15.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EPIANLVKGR GSSGAPPPSG GGGGSGGGGS GGGGSDAHKS
61 EVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQQCP FEDHVKLVNE VTEFAKTCVA DESAENCCKS
121 LHTLFGDKLC TVATLRETYG EMADCCAKQE PERNECFLOH KDDNPNLPRL VRPEVDVMCT
181 AFHNEETFL KKYLYETARR HPYFYAPELL FFAKRYKAAF TECCQAADKA ACLLPKLDEL
241 RDEGKASSAK QRLKASLQK FGERAFKANA VARLSQRFPK AEFAEVSKLV TDLTKVHTEC
301 CHGDLLECAD DRADLAKYIC ENQDSISSKL KECCEKPLLE KSHCIAEVEN DENPADLPSL
361 AADFVESKDV CKNYAEAKDV FLGMFLYFYA RRRHFDYSVVL LLLRLAKTYET TLEKCCAAAD
421 PHECYAKVFD EFKPLVEEPQ MLKQNCCLF EQLGEYKFOH ALLVRYTKKV PQVSTPTLVE
481 VSRNLGKVGS KCCKHPEAKR MPCAEDYLSV VLNQLCVLHE KTFVSDRVTK CCTESLVNRK
541 PCPSALEVDE TYVPKEFNAE TTFPHADICT LSEKERQIKK QTALVELVKH KPKATKEQLK
601 AVMDPFAAFV EKCKRADDKE TCFABEGKOL VAASQAALGL [SEC ID N° 15]

```

- La secuencia de aminoácidos de exendina 4 - albúmina sérica humana se representa en la SEC ID N° 16.

1 HGEFTFTSDL SKQNEEEAVR LFIEMLKNGG PSSGAPPPSD AHKSEVAHRF KDLGKENFKA
 61 LVLIATFAQYL QQCFFEDHVK LVREVTFAK TCVADESAEN CDKSLHTLFG DKLCTVATLR
 121 ETYGEMADCC AKQEPERMEC FLQHDDNPN LPRLVRPEVD VMCTAFHNE ETFLKKYLYE
 181 IARRHPYFYA PELLFAKRY KAAFTTECCQA ADKAACLLPK LDELDEGKA SSAKQRLKCA
 241 SLQKFGERAF KAMAVARLSQ RFFKAFAEV SKLVTDLTKV HTECCHGDLI ECADDRADLA
 301 KYICENQDSI SSKLKECCEK PLEKSHCIA EVENDENPAD LPSLAADFVE SKDVCINYAE
 361 AKDVFLGMFL YEYARRHPDY SVLLLLRLAK TYETTLKCC AAADPHECYA KVFDEPKPLV
 421 KEPQNLKQN CELFEQLGEY KFNALLVRY TKKVPQVSTP TLVEVSRNLG KVGSKCKHP
 481 ENKRPCAED YLSVVLNQLC VLHEKTPVED RVTKCTESL VNRPCPSAL EVDSTYVPKE
 541 FNAETFTFHA DICTLSEKER QIKKQALVE LVKHKPKATK EQLKAVMDDF AAFVEKCKCA
 601 DDKETCFABE GKKLVAASQA ALGL [SEC ID N° 16]

La secuencia de aminoácidos de exendina 4 – engarce - albúmina sérica humana se representa en la SEC ID N° 17.

1 HGEFTFTSDL SKQNEEEAVR LFIEMLKNGG PSSGAPPPSG GGGGSGGGGS GGGGSDAHKS
 61 EVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQCCP FEDHVKLVNE VTEFAKTCVA DESAENCDKS
 121 LHTLFGDKLC TVATLRETYG EMADCCAQE PERNECFLOH KDDNPNLPRL VRPEVDVMCT
 181 AFHDNEETFL KKYLYELARR HPYFYAPELL FFAKRYKAAF TECCQAADKA ACILPKLDEL
 241 RDEGKASSAK QRLKASLQK FGERAFKAMA VARLSQRFPK AFAEVSKLV TDLTKVHTEC
 301 CHGDILLECAD DRADLAKYIC ENQDSISSKL KECCEKPLLE KSHCIAEVEN DENPADLPSL
 361 AADFVESKDV CKNYAEAKDV FLGMFLYEY RRRHPDYSVVL LLRLAKTYET TLECCAAAD
 421 PHECYAKVPD EFKPLVEEPQ NLIKQNCLEF EQLGEYKFN ALLVRYTKV PQVSTPTLVE

5

481 VSRNLGKVGK KCKKHPEAKR NPCAEDYLSV VLNQLCVLHE KTFVSDRVTK CCTESLVNRR
 541 PCPSALEVDE TYVPKEFNAE TFTFHADICT LSEKERQIKK QTALVELVKH KPKATKEQLK
 601 AVMODFAAFV EKCKADDKE TCFAEBGKOL VAASQAALGL [SEC ID N° 17]

La secuencia de aminoácidos de Val⁸ – GLP – 1 – IgG1 se representa en la SEC ID N°

10 18.

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAMLVKGR GAEPKSCDKT HTCFFCPAPE LLOGPSVFLF
61 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VDMAKTKPRE EQYNSTYRVV
121 SVLTVLHQDW LNKKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREENTKNQV
181 SLTCLVKGFY PSDIAVENES NGQPENNYKT TTPVLDSGDS FFLYSKLTVD ASRWQQGNVF
241 SCSVMHEALH NHYTQKLSLS SPGK [SEC ID N° 18]

La secuencia de aminoácidos de Val⁸ – GLP – 1 - CEx – IgG1 se representa en la SEC ID N° 19.

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAMLVKGR GSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPFCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NNYVDGVEVN NAKTKPREEQ
121 YNSTYKVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
181 KENTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVENESNG QPENNYKTTP FVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
241 RNQQGNVFSV SVMHEALHNH YTQKLSLSLP GK [SEC ID N° 19]

5

La secuencia de aminoácidos de Val⁸ – Glu²² GLP – 1 – IgG1 se representa en la SEC ID N° 20.

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFIAMLVKGR GAEPKSCDKT HTCFFCPAPE LLOGPSVFLF
61 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VMNAKTKPRE EQYNSTYRVV
121 SVLTVLHQDW LNKKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKARGQP REPQVYTLPP SREENTKNQV
181 SLTCLVKGFY PSDIAVENES NGQPENNYKT TTPVLDSGDS FFLYSKLTVD ASRWQQGNVF
241 SCSVMHEALH NHYTQKLSLS SPGK [SEC ID N° 20]

10

La secuencia de aminoácidos de Val⁸ – Glu²² GLP – 1 - CEx– IgG1 se representa en la SEC ID N° 21.

98
548

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLANLVKGR GSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPFCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NMYVDGVEVH NAKTKFREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPAPIKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVENESNG QPENNYKTP FVLDSGGSFF LYKLTVDKS
241 RMQQGNVFSC SVMHEALHSH YTKSLSLSP GK [SEC ID N° 21]

La secuencia de aminoácidos de Gly⁸ – Glu²² GLP – 1 – C2 – IgG1 se representa en la SEC ID N° 22.

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLANLVKGR GSSGASSGAA EPKSCDKTHT CPFCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NMYVDGVEVH NAKTKFREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPAPIKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVENESNG QPENNYKTP FVLDSGGSFF LYKLTVDKS
241 RMQQGNVFSC SVMHEALHSH YTKSLSLSP GK [SEC ID N° 22]

5

La secuencia de aminoácidos de Gly⁸ – Glu²² GLP – 1 – CEx – engarce – IgG1 se representa en la SEC ID N° 23.

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLANLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGGSAEPKSC
61 DKTHTCPPCP APFLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNMYVD
121 GVEVHNATK FREEQYNSTY RVSVLTVLN QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIETISKAK
181 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTFFVLDS
241 DGSFFLYSKL TVDKSRNQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK [SEC ID N° 23]

La secuencia de aminoácidos de Gly⁸ – Glu²² - GLP – 1 – CEx – engarce – IgG4 se representa en la SEC ID N° 24.

10

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLANLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGGSAESKYG
61 PPCPSCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSDQEDPEV QFNMYVDGVE
121 VHNATKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
181 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVENES NGQPENNYKT TPFVLDSGGS
241 FFLYSRLTVD KSRNQEGNVF BCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK [SEC ID N° 24]

La secuencia de aminoácidos de Gly⁸ – Glu²² GLP – 1 – CEx – 2 engarce – IgG1 se representa en la SEC ID N° 25.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLANLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGSG GGGSGGGSG
61 GGGSGGGSGA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
121 VSHEDPEVKF NNYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDLN GKRYCKVSN
181 KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVENESNG
241 QFENNYKTPP FVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALH NHYTKLSLSLP
301 GK [SEC ID N° 25]

5 La secuencia de aminoácidos de Gly⁸ – Glu²² GLP – 1 – 2 engarce – IgG1 se representa en la SEC ID N° 26.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLANLVKGR GGGSGGGSG SGGSGGGSG SGGSGGGSG
61 SAEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
121 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LMGKEYCKKV SNKALPAPIE
181 KTISKAKGQP NEPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVENES NGQFENNYKT
241 TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNV? SCVMHEALH NHYTKLSLSL SPGK
[SEC ID N° 26]

La secuencia de aminoácidos de Gly⁸ – Glu²² GLP – 1 – 2 CEx – IgG1 se representa en la SEC ID N° 27.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLANLVKGR GSSGAPPPSS SGAPPPSAEP KSCDKTHTCP
61 PCPAPELLGG PSVFLFPFKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNM YVDGVEVHNA
121 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQWLNKG EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
181 VYTLPPSRER NTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVENESNGQP ENNYKTPPV LDSGGSFFLY
241 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV NHEALHNHNT QKLSLSLSPGK [SEC ID N° 27]

La secuencia de aminoácidos de Gly⁸ – Glu²² – Val²⁵ – Ile³³ GLP – 1 – CEx – engarce – IgG1 se representa en la SEC ID N° 28.

100
550

1 HGGTFTSDV SSYLEQAVK EFLAWLINGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGGSAEPKSC
61 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LAMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNMWYVD
121 GVEVHNARTK FREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDMLNGKEYK CKVENKALPA PIKTISKAK
181 GQPREPQVYT LPPSRREMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WEENGGQFENN YKTPPVLDG
241 DGSFFLYSKL TVDKSRNQGG NVFSCSVNHE ALHNHYTQKS LSLSPGK [SEC ID N° 28]

La secuencia de aminoácidos de exendina - 4 - IgG1 se representa en la SEC ID N° 29.

1 HGGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIENLKNQG PSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPTCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TFEVTCVVVD VSHEDPEVKF NMYVDGVEVH NAKTKFREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDLN GKEYKCKVSN KALPAPIETK ISKAGQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
241 RNQGGNVFSC SVMHEALHGH YTQKSLSLSP GK [SEC ID N° 29]

5

La secuencia de aminoácidos de exendina - 4 - C2 - IgG1 se representa en la SEC ID N° 30.

1 HGGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIENLKNQG PSSGASSGAA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TFEVTCVVVD VSHEDPEVKF NMYVDGVEVH NAKTKFREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDLN GKEYKCKVSN KALPAPIETK ISKAGQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
241 RNQGGNVFSC SVMHEALHGH YTQKSLSLSP GK [SEC ID N° 30]

La secuencia de aminoácidos de exendina - 4 - engarce - IgG1 se representa en la SEC

10 ID N° 31.

1 HGGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIENLKNQG PSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGGSAEPKSC
61 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNMWYVD
121 GVEVHNARTK FREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDMLNGKEYK CKVENKALPA PIKTISKAK
181 GQPREPQVYT LPPSRREMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WEENGGQFENN YKTPPVLDG
241 DGSFFLYSKL TVDKSRNQGG NVFSCSVNHE ALHNHYTQKS LSLSPGK [SEC ID N° 31]

10
551

Tabla 5a: Actividad de los análogos de GLP-1 *in vitro*

<u>Compuesto GLP - 1</u>	<u>Activación del receptor de GLP - 1</u>
GLP-1 (7-37)OH	1.0
Val ⁸ -GLP-1 (7-37)OH	0.47 (n = 6)
Gly ⁸ -His ¹¹ -GLP-1 (7-37)OH	0.282
Val ⁸ -Ala ¹¹ -GLP-1 (7-37)OH	0.021
Val ⁸ -Lys ¹¹ -GLP-1 (7-37)OH	0.001
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1 (7-37)OH	0.81
Val ⁸ -Glu ¹⁶ -GLP-1 (7-37)OH	0.047

102
552

Val ⁸ -Ala ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0.112
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	1.175
Val ⁸ -Lys ²⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.33
Gln ²² -GLP-1(7-37)OH	0.42
Val ⁸ -Ala ²² -GLP-1(7-37)OH	0.56
Val ⁸ -Ser ²² -GLP-1(7-37)OH	0.50
Val ⁸ -Asp ²² -GLP-1(7-37)OH	0.40
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.29
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-37)OH	0.58
Val ⁸ -Pro ²² -GLP-1(7-37)OH	0.01
Val ⁸ -His ²² -GLP-1(7-37)OH	0.14
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	0.53
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	1.0
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.07
Val ⁸ -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	0.18
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.007

103
553

Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.02
Val ⁸ -His ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	1.6
Val ⁸ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	1.5
Val ⁸ -His ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	0.37
Val ⁸ -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	0.47
Gly ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.29
Val ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.29
Val ⁸ -Asp ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.15
Val ⁸ -Ser ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.19
Val ⁸ -His ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.19
Val ⁸ -Glu ³³ -GLP-1(7-37)OH	0.039
Val ⁸ -Ala ³³ -GLP-1(7-37)OH	0.1
Val ⁸ -Gly ³³ -GLP-1(7-37)OH	0.01
Val ⁸ -Glu ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.17
Val ⁸ -Pro ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0.094
Val ⁸ -His ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0.41
Val ⁸ -Glu ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0.15

104
554

Val ⁸ -Glu ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	0.11
Val ⁸ -His ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	0.22
Val ⁸ -His ³⁷ -GLP-1(7-37)OH	0.33
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	0.23
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.37
Val ⁸ -Lys ²³ -Glu ³³ -GLP-1(7-37)OH	0.35
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	1.02
Val ⁸ -Glu ²² -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	1.43
Val ⁸ -Lys ³³ -Val ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.08
Val ⁸ -Lys ³³ -Asn ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.09
Val ⁸ -Gly ³⁴ -Lys ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0.34
Val ⁸ -Gly ³⁶ -Pro ³⁷ -GLP-1(7-37)NH ₂	0.53

Tabla 5b. Actividad de análogos de GLP - 1 *in vivo* cti.

Compuesto d GLP - 1	Activación del receptor de GLP - 1
GLP-1(7-37)OH	1.0
Val ⁸ -GLP-1(7-37)OH	0.47
Gly ⁸ -GLP-1(7-37)OH	0.80
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-37)OH	0.80
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-36)NH ₂	0.52
Val ⁸ -Trp ¹² -GLP-1(7-37)OH	0.52
Val ⁸ -Leu ¹⁸ -GLP-1(7-37)OH	0.52
Val ⁸ -Val ¹⁸ -GLP-1(7-37)OH	0.52
Val ⁸ -Tyr ¹⁸ -GLP-1(7-37)OH	1.18
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.03
Val ⁸ -Leu ²² -GLP-1(7-37)OH	0.24
Val ⁸ -Tyr ¹² -Tyr ¹⁸ -GLP-1(7-37)OH	0.70
Val ⁸ -Trp ¹² -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	0.80
Val ⁸ -Tyr ¹² -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.27
Val ⁸ -Tyr ¹⁸ -Phe ¹⁹ -GLP-1(7-37)OH	1.32
Val ⁸ -Tyr ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.69, 1.79
Val ⁸ -Trp ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2.30, 2.16
Val ⁸ -Leu ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2.02
Val ⁸ -Ile ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.55
Val ⁸ -Phe ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.08
Val ⁸ -Trp ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.50, 3.10
Val ⁸ -Tyr ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2.40, 2.77
Val ⁸ -Phe ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	0.94
Val ⁸ -Ile ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.88
Val ⁸ -Lys ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.18
Val ⁸ -Trp ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.50
Val ⁸ -Phe ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	0.70
Val ⁸ -Phe ²⁰ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.27

106
556

Val ⁸ -Glu ²² -Leu ²⁵ -GLP-1(7-37)OH	1.32
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ²⁵ -GLP-1(7-37)OH	1.46
Val ⁸ -Glu ²² -Val ²⁵ -GLP-1(7-37)OH	2.21, 1.36
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	0.94
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	1.03
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ³³ -GLP-1(7-37)OH	2.21, 1.79, 1.60
Val ⁸ -Asp ⁹ -Ile ¹¹ -Tyr ¹⁶ -Glu ²² - GLP-1(7-37)OH	2.02
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Trp ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1(7- 37)OH	1.64
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Val ²⁵ -Ile ³³ - GLP-1(7-37)OH	2.35
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Ile ³³ -GLP-1(7- 37)OH	1.93
Val ⁸ -Glu ²² -Val ²⁵ -Ile ³³ -GLP-1(7- 37)OH	2.30, 2.73, 3.15
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Val ²⁵ -GLP-1(7- 37)OH	2.07
Val ⁸ -Cys ¹⁶ -Lys ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	1.97
Val ⁸ -Cys ¹⁶ -Lys ²⁶ -Arg ³⁴ -GLP-1(7- 37)OH	2.4, 1.9

107
55+

Tabla 6. Actividad *in vitro* de análogos de GLP/exendina

Secuencia de péptidos	Actividad <i>in vitro</i> (% de Val – GLP – 1 (7 – 37) OH)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLNKGGP-NH2	6.21
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLNKGGPSSGAPP PS-NH2	6.75, 3.25
HVEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIANLVKGRG	2.86
HVEGTFTSDVSSYLEEEAVRLFIANLVKGRG	1.47
HVEGTFTSDLSKQMEGQAAKEFIANLVKGRG	0.11

HVEGTFTSDVSKQMEGQAAKEFIANLVKGRG	0.04
HGEGTFTSDLSKQMEGQAAKEFIEWLNKGGP-NH2	1.44
HGEGTFTSDLSKQMEEEAAKEFIEWLNKGGP-NH2	2.80
HGEGTFTSDVSSYLEEEAVRLFIEWLNKGGP-NH2	5.40
HGEGTFTSDLSSYLEEEAVRLFIEWLNKGGP-NH2	5.07
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIANLVKGRPSSGAPPPS -NH2	3.30
HAEGTFTSDVSKQLEEEAAKEFIANLVKGRG	2.15
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLNKGGP-NH2	2.36
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIANLVKGRG	3.25
HVEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIANLVKGRG	1.00
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIANLVKGRG	0.20
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIANLVKGRG	1.00
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIANLVKGRG	2.12

Ejemplo 7: Farmacocinética *in vivo* de Val⁸ – GLP – 1 – IgG1 y Val⁸ – GLP – 1- HSA:

5 Se realizó en monos cinomólogos un estudio farmacocinético de Val⁸ – GLP – 1 – IgG1 y Val⁸ – GLP – 1 – HSA. Se administró una dosis a los monos de 5,6 nmoles/kg

- tanto con Val⁸ – GLP – 1 – IgG1 o con Val⁸ – GLP – 1 – HSA purificadas. Se administraron los compuestos en forma de administración intravenosa de un bolo. Se recogió sangre antes de la administración de la dosis y a 0,083, 0,25, 0,5, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 216 horas después de la dosis en tubos que contenían EDTA.
- 5 Se determinaron las concentraciones en plasma de Val⁸ – GLP – 1 inmunorreactiva utilizando un radioinmunoensayo que utiliza un antisuero policlonal cuya especificidad principal es para la región (7 – 16) del extremo N terminal de Val⁸ – GLP – 1 (7 – 37). La figura 9 representa la concentración en plasma de Val⁸ – GLP – 1 – Fc y Val⁸ – GLP – 1 – engarce – HSA seguido de una dosis única intravenosa a dos monos cinomólogos.
- 10 La proteína de fusión de Fc tenía una semivida de aproximadamente 45 horas y la proteína de fusión de albúmina tenía una semivida de aproximadamente 87 horas.

Ejemplo 8: Farmacodinámica *in vivo* de exendina – 4 – IgG1:

- Se estudiaron dos perros sabuesos macho normales canulados crónicamente después de una noche de ayuno. Se accedió a puertos de acceso vascular venoso y
- 15 arterial y se insertó percutáneamente un catéter en una vena cefálica y se aseguró. Los animales se colocaron en jaulas y sus catéteres se acoplaron a un sistema giratorio / de correas. Una solución que contenía la proteína de fusión exendina – 4 – IgG1 (11, 8µM) se inyectó intravenosamente (1,0 nmoles/kg) a través del catéter de la vena cefálica. Después se limpió el catéter con 10 ml de solución salina. Dos horas después, se inició
- 20 una pinza hiperglucémica (150 mg/dl) y se continuó durante tres horas. Se tomaron muestras de sangre arterial durante este período de 5 horas para determinar las concentraciones en plasma de la proteína de fusión, glucosa e insulina.

- Los resultados de este estudio se compararon con los de un estudio similar previo en el que los dos animales habían recibido un bolo de solución salina., s.
- 25 c. y tres horas más tarde se estudiaron utilizando una pinza hiperglucémica durante 3

horas (150 mg/dl).

En ambos conjuntos de estudios, las concentraciones de glucosa en plasma se determinaron usando un analizador de glucosa Beckman. Las concentraciones de insulina en plasma se determinaron mediante personal empleado de Linco Research, Inc. Usando un equipo RIA desarrollado en sus laboratorios. Los datos se ilustran en las figuras 10 y 11.

Ejemplo 9: farmacocinética *in vivo* de Gly⁸ - Glu²² - GLP - 1 - CEx - engarce - IgG1:

10 Dos grupos de tres perros sabuesos machos normales recibieron 0,1 mg/Kg de Gly⁸ - Glu²² - GLP - 1 - CEx - engarce - IgG1 mediante administración subcutánea (abreviadamente SC) o intravenosa (abreviadamente IV). Las concentraciones en plasma de la inmunorreactividad de Gly⁸ - Glu²² - GLP - 1 - CEx - engarce - IgG1 se determinaron mediante radioinmunoensayo en muestras recogidas desde 30 minutos
15 antes de la dosis hasta 216 horas después de la dosis para ambos grupos IV y SC. Estas concentraciones se usaron posteriormente para determinar los parámetros farmacocinéticos indicados. La semivida de eliminación media de Gly⁸ - Glu²² - GLP - 1 - CEx - engarce - IgG1 administrada IV fue aproximadamente de 55 horas y la eliminación total en el cuerpo era de 1,5 ml/h/kg. La semivida de eliminación media de
20 la Gly⁸ - Glu²² - GLP - 1 - CEx - engarce - IgG1 administrada SC fue aproximadamente de 38 horas.

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

CAPITULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

- 5 1. Una proteína de fusión heteróloga que comprende un primer polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal condensados con un segundo polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal en la que el primer polipéptido es un compuesto GLP - 1 y el segundo polipéptido se selecciona del grupo constituido por

 - a) albúmina humana;
 - 10 b) análogos de albúmina humana; y
 - b) fragmentos de albúmina humana,

y en la que el extremo C terminal del primer polipéptido se fusiona al extremo N terminal del segundo polipéptido.

- 15 2. Una proteína de fusión heteróloga que comprende un primer polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal condensados con un segundo polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal en la que el primer polipéptido es un compuesto de GLP - 1 y el segundo polipéptido se selecciona del grupo constituido por

 - 20 a) albúmina humana;
 - b) análogos de albúmina humana; y
 - c) fragmentos de albúmina humana,

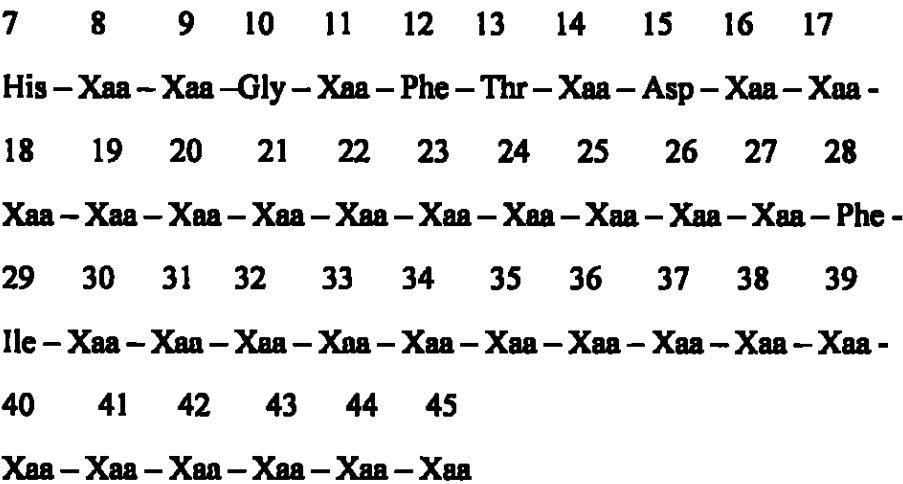
y en la que el extremo C terminal del primer polipéptido se fusiona al extremo N terminal del segundo polipéptido mediante un enlazador de péptidos.

25

3. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 2 en la que el engarce de péptidos se selecciona del grupo constituido por:
- a) un péptido rico en glicina;
 - b) un péptido que tiene la secuencia [Gly – Gly – Gly – Gly - Ser]_n en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, ó 6; y
 - c) un péptido que tiene la secuencia [Gly – Gly – Gly – Gly - Ser]₃.

4. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 1, 2, ó 3 en la que el compuesto de GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula I [SEC ID N° 2]

10



15

Fórmula I (SEC ID N° 2)

20

- en la que:
- Xaa en la posición 8 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
 - Xaa en la posición 9 es Glu, Asp, o Lys;
 - Xaa en la posición 11 es Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
 - Xaa en la posición 14 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
 - Xaa en la posición 16 es Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp o

25

Lys;

Xaa en la posición 17 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 18 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr o Lys;

5 Xaa en la posición 19 es Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, o Lys;

Xaa en la posición 20 es Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr o Lys;

Xaa en la posición 21 es Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 22 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys

10 Xaa en la posición 23 es Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 24 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 25 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 26 es Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, o His;

Xaa en la posición 27 es Leu, Glu, Asp o Lys;

15 Xaa en la posición 30 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 31 es Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 32 es Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 33 es Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 34 es Asn, Lys, Arg, Glu, Asp o His;

20 Xaa en la posición 35 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

Xaa en la posición 36 es Gly, Arg, Lys, Glu, Asp o His;

Xaa en la posición 37 es Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys o

se ha suprimido;

Xaa en la posición 38 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp o His o se ha suprimido;

25 Xaa en la posición 39 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp o His, o se ha suprimido;

113
563

Xaa en la posición 40 es Gly, Asp, Glu o Lys o se ha suprimido;
Xaa en la posición 41 es Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;
Xaa en la posición 42 es Ser, Pro, Lys, Glu o Asp, o se ha suprimido;
Xaa en la posición 43 es Ser, Pro, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;
5 Xaa en la posición 44 es Gly, Pro, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;
y
Xaa en la posición 45 es Ala, Ser, Val, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;
con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 ó
44 se ha suprimido, entonces cada aminoácido cadena abajo de ese aminoácido también
10 se ha suprimido.

5. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en la que el
compuesto de GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula II (SEC ID N° 3)

15 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa – Xaa – Xaa – Gly – Xaa – Xaa – Thr – Ser – Asp – Xaa – Ser –
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Xaa – Tyr – Leu – Glu – Xaa – Xaa – Xaa – Ala – Xaa – Xaa – Phe –
29 30 31 32 33 34 35 36 37
20 Ile – Xaa – Xaa – Leu – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa

Fórmula II (SEC ID N° 3)

en la que:

Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D – histidina, desaminohistidina, 2 -
aminohistidina, β – hidroxihistidina, homohistidina, α – fluorometilhistidina o α –
25 metilhistidina;

114
564

- Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;
Xaa en la posición 9 es: Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu o His;
Xaa en la posición 11 es: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys o His;
Xaa en la posición 12 es: His, Trp, Phe o Tyr;
5 Xaa en la posición 16 es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr, Glu o Ala;
Xaa en la posición 18 es: His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala o Lys;
Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;
Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu, Gln o Arg;
Xaa en la posición 24 es: Glu, Arg, Ala o Lys;
10 Xaa en la posición 26 es: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu o His;
Xaa en la posición 27 es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;
Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;
Xaa en la posición 31 es: Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp o Lys;
Xaa en la posición 33 es: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly o Glu;
15 Xaa en la posición 34 es: Glu, Lys o Asp;
Xaa en la posición 35 es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o
Glu;
Xaa en la posición 36 es: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu o His;
Xaa en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly,
20 Gly – Pro o se ha suprimido.

6. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en la que el
compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula III (SEC ID N° 4)
- 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
- 25 Xaa – Xaa – Glu – Gly – Xaa – Xaa – Thr – Ser – Asp – Xaa – Ser -

115
565

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser – Tyr – Leu – Glu – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Lys – Xaa – Phe –
29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile – Xaa – Trp – Leu – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa

5 Fórmula III (SEC ID N° 4)

en la que:

Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α - metilhistidina;

10 Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa en la posición 11 es: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys o His;

Xaa en la posición 12 es: His, Trp, Phe o Tyr;

Xaa en la posición 16 es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;

Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;

15 Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu o Gln;

Xaa en la posición 24 es: Glu, His, Ala o Lys;

Xaa en la posición 25 es: Asp, Lys, Glu o His;

Xaa en la posición 27 es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;

Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;

20 Xaa en la posición 33 es: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly o Glu;

Xaa en la posición 34 es: Glu, Lys o Asp;

Xaa en la posición 35 es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o Glu;

Xaa en la posición 36 es: Asp, Glu o His;

25 Xaa en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly,

Gly – Pro o se ha suprimido.

7. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en la que el compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula IV (SEC ID N° 5)

5

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa – Xaa – Glu – Gly – Thr – Xaa – Thr – Ser – Asp – Xaa – Ser –
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser – Tyr – Leu – Glu – Xaa – Xaa – Ala – Ala – Xaa – Glu – Phe –
10 29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile – Xaa – Trp – Leu – Val – Lys – Xaa – Arg – Xaa

Fórmula IV (SEC ID N° 5)

en la que:

Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 -
15 aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α -
metilhistidina;

Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, o Thr;

Xaa en la posición 12 es: His, Trp, Phe o Tyr;

Xaa en la posición 16 es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;

20 Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;

Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu o Gln;

Xaa en la posición 26 es: Asp, Lys, Glu o His;

Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;

25 Xaa en la posición 35 es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o
Glu;

Xaa en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly – Pro o Gly – Pro - NH₂, o se ha suprimido.

8. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en la que el compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula V (SEC ID N° 6)

5 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa – Xaa – Glu – Gly – Thr – Phe – Thr – Ser – Asp – Val – Ser –
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser – Tyr – Leu – Glu – Xaa – Xaa – Ala – Ala – Lys – Xaa – Phe –
29 30 31 32 33 34 35 36 37
10 Ile – Xaa – Trp – Leu – Val – Lys – Gly – Arg – Xaa

Fórmula V (SEC ID N° 6)

en la que:

- Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 -
aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α -
15 metilhistidina;

Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;

Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu o Gln;

Xaa en la posición 24 es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;

- 20 Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;

Xaa en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly,
Gly – Pro o se ha suprimido.

9. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en la que el
25 compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula VIII (SEC ID N° 11)

118
568

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa – Xaa – Glu – Gly – Thr – Phe – Thr – Ser – Asp – Xaa – Ser -
5 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Xaa – Xaa – Xaa – Glu – Xaa – Xaa – Ala – Xaa – Xaa – Xaa – Phe -
29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile – Xaa – Trp – Leu – Xaa – Xaa – Gly – Xaa – Xaa

Fórmula VIII (SEC ID N° 11)

10 en la que:

Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α - metilhistidina;

Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala o Val;

15 Xaa en la posición 16 es: Leu o Val;

Xaa en la posición 18 es: Lys o Ser;

Xaa en la posición 19 es: Gln o Tyr;

Xaa en la posición 20 es: Met o Leu;

Xaa en la posición 22 es: Glu o Gln;

20 Xaa en la posición 23 es: Glu o Gln;

Xaa en la posición 25 es: Val o Ala;

Xaa en la posición 26 es: Arg o Lys;

Xaa en la posición 27 es: Leu o Glu;

Xaa en la posición 30 es: Glu o Ala;

25 Xaa en la posición 33 es: Val o Lys;

119
569

Xaa en la posición 34 es: Asn o Lys;

Xaa en la posición 36 es: Gly o Arg; y

Xaa en la posición 37 es: Gly, Pro, Pro – Ser – Ser – Gly – Ala – Pro – Pro –
Pro – Ser, o se esta ausente.

5

10. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 1 a 9 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 6 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH, GLP – 1 (7 – 36) OH o exendina – 4.

10

11. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 10 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 5 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH, GLP – 1 (7 – 36) OH o exendina – 4.

15

12. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 11 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 4 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH, GLP – 1 (7 – 36) OH o exendina – 4.

20

13. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 12 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 3 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH, GLP – 1 (7 – 36) OH o exendina – 4.

25

120
570

14. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 13 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 2 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH, GLP – 1 (7 – 36) OH o exendina – 4.
- 5
15. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 14 en la que Xaa en la posición 8 es glicina o valina.
- 10
16. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 8 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 2 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH o GLP – 1 (7 – 36)OH y Xaa en la posición 8 es glicina o valina y Xaa en la posición 30 es alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, serina o histidina.
- 15
17. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 16 en la que Xaa en la posición 30 es ácido glutámico.
- 20
18. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 8 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 2 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH o GLP – 1 (7 – 36)OH y Xaa en la posición 8 es glicina o valina y Xaa en la posición 37 es histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, arginina o lisina.
- 25
19. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 18 en la que Xaa en la

121
521

posición 37 es histidina.

- 5 20. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 8 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 2 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH o GLP – 1 (7 – 36)OH y Xaa en la posición 8 es glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y Xaa en la posición 22 es ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, asparagina, glutamina o histidina.
- 10 21. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 20 en la que Xaa en la posición 22 es lisina o ácido glutámico.
- 15 22. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 8 en la que el compuesto GLP – 1 es Val⁸ – GLP – 1 (7 – 37).
23. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 8 en la que el compuesto GLP – 1 es Gly⁸ – GLP – 1 (7 – 37).
- 20 24. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 23 en la que el segundo polipéptido es albúmina humana.
- 25 25. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 24 en la que el segundo polipéptido tiene la secuencia de SEC ID N° 34.
26. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones de

122
572

1 a 23 en la que el segundo polipéptido es un fragmento del extremo N terminal de albúmina.

5 27. Una proteína de fusión heteróloga que comprende un primer polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal fusionado a un segundo polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal en la que el primer polipéptido es un compuesto GLP – 1 y el segundo polipéptido se selecciona del grupo constituido por

- a) la porción Fc de una inmunoglobulina;
- b) un análogo de la porción Fc de una inmunoglobulina;

10 y

- c) fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina, y en la que el extremo C terminal del primer polipéptido está condensado con extremo N terminal del segundo polipéptido.

15 28. Una proteína de fusión heteróloga que comprende un primer polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal condensado a un segundo polipéptido con un extremo N terminal y un extremo C terminal en la que el primer polipéptido es un compuesto GLP – 1 y el segundo polipéptido se selecciona del grupo constituido por

- 20
- a) la porción Fc de una inmunoglobulina;
 - b) un análogo de la porción Fc de una inmunoglobulina;

y

- c) fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina, y en la que el extremo C terminal del primer polipéptido está condensado con el extremo N terminal del segundo polipéptido mediante un engarce de
- 25

123
513

péptidos.

29. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 28 en la que el engarce de péptidos se selecciona del grupo constituido por
- 5

a) un péptido rico en glicina;

b) un péptido que tiene la secuencia [Gly – Gly – Gly – Gly - Ser]_n en la que n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6; y

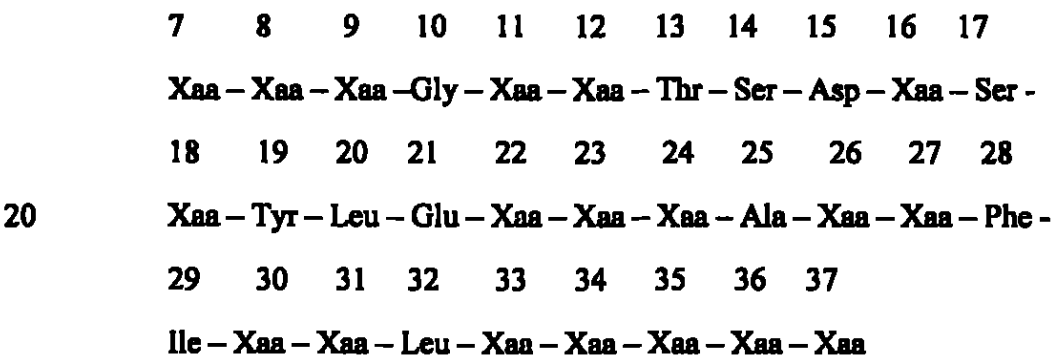
c) un péptido que tiene la secuencia [Gly – Gly – Gly – Gly - Ser]₃.
1030. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 27, 28 ó 29 en la que el compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula 1 [SEC ID N° 2]
- 7891011121314151617
- His – Xaa – Xaa – Gly – Xaa – Phe – Thr – Xaa – Asp – Xaa – Xaa -
- 151819202122232425262728
- Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Phe -
- 2930313233343536373839
- Ile – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa -
- 404142434445
- 20Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa
- Fórmula I (SEC ID N° 2)
- en la que:
- Xaa en la posición 8 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 9 es Glu, Asp, o Lys;
- 25Xaa en la posición 11 es Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

124
574

- Xaa en la posición 14 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 16 es Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp o Lys;
- Xaa en la posición 17 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- 5 Xaa en la posición 18 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr o Lys;
- Xaa en la posición 19 es Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, o Lys;
- Xaa en la posición 20 es Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr o Lys;
- 10 Xaa en la posición 21 es Glu, Asp, o Lys;
- Xaa en la posición 22 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys
- Xaa en la posición 23 es Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, o Lys;
- Xaa en la posición 24 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 25 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- 15 Xaa en la posición 26 es Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, o His;
- Xaa en la posición 27 es Leu, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 30 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 31 es Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 32 es Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- 20 Xaa en la posición 33 es Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 34 es Asn, Lys, Arg, Glu, Asp o His;
- Xaa en la posición 35 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;
- Xaa en la posición 36 es Gly, Arg, Lys, Glu, Asp o His;
- Xaa en la posición 37 es Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys o
- 25 se ha suprimido;

- Xaa en la posición 38 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp o His o se ha suprimido;
Xaa en la posición 39 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp o His, o se ha suprimido;
Xaa en la posición 40 es Gly, Asp, Glu o Lys o se ha suprimido;
Xaa en la posición 41 es Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;
5 Xaa en la posición 42 es Ser, Pro, Lys, Glu o Asp, o se ha suprimido;
Xaa en la posición 43 es Ser, Pro, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;
Xaa en la posición 44 es Gly, Pro, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;
y
Xaa en la posición 45 es Ala, Ser, Val, Glu, Asp o Lys, o se ha suprimido;
10 con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 37, 38, 39, 40, 41,
42, 43 ó 44 se ha suprimido, después cada aminoácido cadena abajo de este aminoácido
también se ha suprimido.

31. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 27, 28 ó 29 en la
15 que el compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula II (SEC ID N° 3):



Fórmula II (SEC ID N° 3)

en la que:

- 25 Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D – histidina, desaminohistidina, 2 -

aminohistidina, β – hidroxihistidina, homohistidina, α – fluorometilhistidina o α – metilhistidina;

- Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;
- Xaa en la posición 9 es: Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu o His;
- 5 Xaa en la posición 11 es: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys o His;
- Xaa en la posición 12 es: His, Trp, Phe o Tyr;
- Xaa en la posición 16 es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr, Glu o Ala;
- Xaa en la posición 18 es: His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala o Lys;
- Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;
- 10 Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu, Gln o Arg;
- Xaa en la posición 24 es: Glu, Arg, Ala o Lys;
- Xaa en la posición 26 es: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu o His;
- Xaa en la posición 27 es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;
- Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;
- 15 Xaa en la posición 31 es: Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp o Lys;
- Xaa en la posición 33 es: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly o Glu;
- Xaa en la posición 34 es: Glu, Lys o Asp;
- Xaa en la posición 35 es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o Glu;
- 20 Xaa en la posición 36 es: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu o His;
- Xaa en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly – Pro o se ha suprimido.

32. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 27, 28 ó 29 en la
- 25 que el compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula III (SEC ID N° 4):

127
577

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa – Xaa – Glu – Gly – Xaa – Xaa – Thr – Scr – Asp – Xaa – Ser –
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
5 Ser – Tyr – Leu – Glu – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – Lys – Xaa – Phe –
29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile – Xaa – Trp – Leu – Xaa – Xaa – Xaa – Xaa – R

Fórmula III (SEC ID N° 4)

en la que:

- 10 Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β – hidroxihistidina, homohistidina, α – fluorometilhistidina o α – metilhistidina;
- Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;
- Xaa en la posición 11 es: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys o His;
- 15 Xaa en la posición 12 es: His, Trp, Phe o Tyr;
- Xaa en la posición 16 es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;
- Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;
- Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu o Gln;
- Xaa en la posición 24 es: Glu, His, Ala o Lys;
- 20 Xaa en la posición 25 es: Asp, Lys; Glu o His;
- Xaa en la posición 27 es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;
- Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;
- Xaa en la posición 33 es: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly o Glu;
- Xaa en la posición 34 es: Glu, Lys o Asp;
- 25 Xaa en la posición 35 es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o

128
578

Glu;

Xaa en la posición 36 es: Asp, Glu o His;

Xaa en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly,
Gly – Pro o se ha suprimido.

5

33. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 27, 28 ó 29 en la
que el compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula IV (SEC ID Nº 5):

	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
10	Xaa – Xaa – Glu – Gly – Thr – Xaa – Thr – Ser – Asp – Xaa – Ser -										
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	Ser – Tyr – Leu – Glu – Xaa – Xaa – Ala – Ala – Xaa – Glu – Phe -										
	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
	Ile – Xaa – Trp – Leu – Val – Lys – Xaa – Arg – Xaa										

15 Fórmula IV (SEC ID Nº 5)
en la que:

Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 -
aminohistidina, β – hidroxihistidina, homohistidina, α – fluorometilhistidina o α –
metilhistidina;

20 Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, o Thr;
Xaa en la posición 12 es: His, Trp, Phe o Tyr;
Xaa en la posición 16 es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;
Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;
Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu o Gln;
25 Xaa en la posición 26 es: Asp, Lys, Glu o His;

129
579

Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;

Xaa en la posición 35 es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o Glu;

Xaa en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly,
5 Gly – Pro o se ha suprimido.

34. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 27, 28 ó 29 en la que el compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de V (SEC ID N° 6):

	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Xaa – Xaa – Glu – Gly – Thr – Phe – Thr – Ser – Asp – Val – Ser –										
10	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	Ser – Tyr – Leu – Glu – Xaa – Xaa – Ala – Ala – Lys – Xaa – Phe –										
	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
	Ile – Xaa – Trp – Leu – Val – Lys – Gly – Arg – Xaa										

Fórmula V (SEC ID N° 6)
15 en la que:

Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α - metilhistidina;

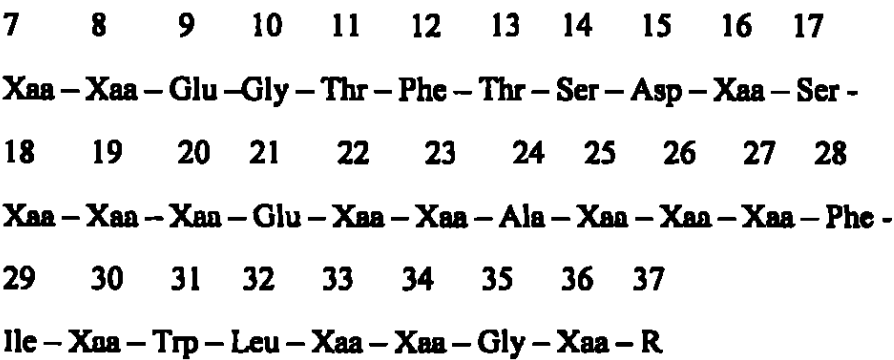
Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;
20 Xaa en la posición 22 es: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;
Xaa en la posición 23 es: His, Asp, Lys, Glu o Gln;
Xaa en la posición 24 es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;
Xaa en la posición 30 es: Ala, Glu, Asp, Ser o His;

Xaa en la posición 37 es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly,
25 Gly – Pro o se ha suprimido.

130
580

35. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 27, 28 ó 29 en la que el compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula VIII [SEC ID N° 11]

5



10

Fórmula VIII (SEC ID N° 11)

en la que:

Xaa en la posición 7 es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 -
15 aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α -
metilhistidina;

Xaa en la posición 8 es: Gly, Ala o Val;

Xaa en la posición 16 es: Leu o Val;

Xaa en la posición 18 es: Lys o Ser;

20

Xaa en la posición 19 es: Gln o Tyr;

Xaa en la posición 20 es: Met o Leu;

Xaa en la posición 22 es: Glu o Gln;

Xaa en la posición 23 es: Glu o Gln;

Xaa en la posición 25 es: Val o Ala;

25

Xaa en la posición 26 es: Arg o Lys;

- Xaa en la posición 27 es: Leu o Glu;
 Xaa en la posición 30 es: Glu o Ala;
 Xaa en la posición 33 es: Val o Lys;
 Xaa en la posición 34 es: Asn o Lys;
 5 Xaa en la posición 36 es: Gly o Arg; y
 Xaa en la posición 37 es: Gly, Pro, Pro – Ser – Ser – Gly – Ala – Pro – Pro – Pro
 – Ser o está ausente.

10 36. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 27 a 35 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 6 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH, GLP – 1 (7 – 36) OH o exendina – 4.

15 37. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 36 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 5 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH, GLP – 1 (7 – 36) OH o exendina – 4.

20 38. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 37 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 4 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH, GLP – 1 (7 – 36) OH o exendina – 4.

25 39. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 38 en la que el compuesto GLP – 1 no tiene más de 3 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP – 1 (7 – 37) OH, GLP – 1 (7 – 36) OH o exendina – 4.

40. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 39 en la que el compuesto GLP - 1 no tiene más de 2 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP - 1 (7 - 37) OH, GLP - 1 (7 - 36) OH o exendina - 4.

5

41. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de la reivindicaciones 27 a 40 en la que Xaa en la posición 8 es glicina o valina.

42. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 34 en la que el compuesto GLP - 1 no tiene más de 2 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP - 1 (7 - 37) OH o GLP - 1 (7 - 36)OH y Xaa en la posición 8 es glicina o valina y Xaa en la posición 30 es alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, serina o histidina.

10

43. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 42 en la que Xaa en la posición 30 es ácido glutámico.

15

44. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 34 en la que el compuesto GLP - 1 no tiene más de 2 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP - 1 (7 - 37) OH o GLP - 1 (7 - 36)OH y Xaa en la posición 8 es glicina o valina y Xaa en la posición 37 es histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, arginina o lisina.

20

45. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 44 en la que Xaa en la posición 37 es histidina.

25

46. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 34 en la que el compuesto GLP - 1 no tiene más de 2 aminoácidos que son diferentes del correspondiente aminoácido en GLP - 1 (7 - 37) OH o GLP - 1 (7 - 36) y Xaa en la posición 8 es glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina o metionina y Xaa en la posición 22 es ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, asparagina, glutamina o histidina.

47. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 46 en la que Xaa en la posición 22 es lisina o ácido glutámico.

48. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 34 en la que el compuesto GLP - 1 es Val - 8 - GLP - 1 (7 - 37).

49. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 34 en la que el compuesto GLP - 1 es Gly - 8 - GLP - 1 (7 - 37).

50. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 49 en la que el segundo polipéptido es la porción Fc de una Ig seleccionada del grupo constituido por: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD o IgM.

51. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 50 en la que el segundo polipéptido es la porción Fc de una Ig seleccionada del grupo constituido por: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

52. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 51 en la que el segundo polipéptido es la porción Fc de una inmunoglobulina IgG1.
53. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 51 en la que el segundo polipéptido es la porción Fc de una inmunoglobulina IgG4.
54. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 50 a 53 en la que la IgG es humana.
55. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 54 en la que la porción Fc comprende los dominios de la región flexible, CH₂ y CH₃.
56. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 52 en la que el segundo polipéptido tiene la secuencia de SEC ID NO 32.
57. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56.
58. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 57.
59. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 58.
60. Una célula huésped que expresa al menos una proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56.

61. La célula huésped de la reivindicación 60 en la que dicha célula huésped es una célula del ovario de un hámster chino (CHO).

5 62. Un procedimiento para producir una proteína de fusión heteróloga que comprende las etapas de transcripción y traducción de un polinucleótido de la reivindicación 57 en condiciones en las que la proteína de fusión heteróloga se expresa en cantidades detectables.

10 63. Un procedimiento para normalizar los niveles de glucosa en sangre en un mamífero en necesidad del mismo que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56.

15 64. Un procedimiento para tratar un paciente con diabetes mellitus no insulino dependiente que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56.

20 65. Un procedimiento para tratar la obesidad que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56.

25 66. El uso de una proteína de fusión heteróloga como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56 para la elaboración de un medicamento con el fin de tratar a pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente.

67. El uso de una proteína de fusión heteróloga como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56 para la elaboración de un medicamento con el fin de tratar a pacientes con obesidad.

5

68. Una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de pacientes con diabetes no insulino dependiente que comprende una proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56.

10 69. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en la que el compuesto de GLP - 1 comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula IX (SEC ID N° 12)

**Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Gln-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-
Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Lys-Gly-Arg-Xaa₃₇**

15 Fórmula IX (SEC ID N° 12)

en la que:

Xaa₇ es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α - metilhistidina;

20 Xaa₈ es: Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa₁₂ es: Phe, Trp o Tyr;

Xaa₁₆ es: Val, Trp, Ile, Leu, Phe o Tyr;

132
587

- Xaa₁₈ es: Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val;
Xaa₁₉ es: Tyr, Trp o Phe;
Xaa₂₀ es: Leu, Phe, Tyr o Trp;
5 Xaa₂₂ es: Gly, Glu, Asp o Lys;
Xaa₂₅ es: Ala, Val, Ile, o Leu;
Xaa₂₇ es: Glu, Ile o Ala;
Xaa₃₀ es: Ala o Glu;
Xaa₃₃ es: Val o Ile; y
10 Xaa₃₇ es: Gly, His, NH₂ ó está ausente.

70. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 69 en la que el segundo polipéptido es albúmina humana.
- 15 71. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 70 en la que el segundo polipéptido tiene la secuencia SEC ID N° 34.
72. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 69 en la que el segundo polipéptido es un fragmento del extremo N terminal de albúmina.
- 20 73. La proteína de fusión heteróloga de una cualquiera de las reivindicaciones 27, 28 ó 29 en la que el compuesto GLP – 1 comprende la secuencia de fórmula IX (SEC ID N° 12)

**Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Gln-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-
Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Lys-Gly-Arg-Xaa₃₇**

Fórmula IX (SEC ID N° 12)

en la que:

5 Xaa₇ es: L - histidina, D - histidina, desaminohistidina, 2 - aminohistidina, β - hidroxihistidina, homohistidina, α - fluorometilhistidina o α - metilhistidina;

Xaa₈ es: Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa₁₂ es: Phe, Trp o Tyr;

Xaa₁₆ es: Val, Trp, Ile, Leu, Phe o Tyr;

10 Xaa₁₈ es: Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val;

Xaa₁₉ es: Tyr, Trp o Phe;

Xaa₂₀ es: Leu, Phe, Tyr o Trp;

Xaa₂₂ es: Gly, Glu, Asp o Lys;

Xaa₂₅ es: Ala, Val, Ile, o Leu;

15 Xaa₂₇ es: Glu, Ile o Ala;

Xaa₃₀ es: Ala o Glu;

Xaa₃₃ es: Val o Ile; y

Xaa₃₇ es: Gly, His, NH₂ ó está ausente.

20 74. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 73 en la que el segundo polipéptido es la porción Fc de una Ig seleccionada del grupo constituido por IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD o IgM.

75. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 73 ó 74 en la que el segundo polipéptido es la porción Fc de una Ig seleccionada del grupo constituido por: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

5

76. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 75 en la que el segundo polipéptido es la porción Fc de una inmunoglobulina IgG1.

77. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 75 en la que el
10 segundo polipéptido es la porción Fc de una inmunoglobulina IgG4.

78. La proteína de fusión heteróloga de las reivindicaciones 73 a 78 en la que la IgG es humana.

15 79. La proteína de fusión heteróloga de la reivindicación 75 en la que el segundo polipéptido tiene la secuencia de SEC ID N° 32.

80. La proteína de fusión heteróloga de una cualquier de las reivindicaciones 69 a 79 en la que el compuesto GLP – 1 se selecciona del grupo constituido por

140
590

Fig. 1

				5					10					15
Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				20					25					30
Pro	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				35					40					45
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Lys	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				50					55					60
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
				65					70					75
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
				80					85					90
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
				95					100					105
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				110					115					120
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				125					130					135
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				140					145					150
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				155					160					165
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				170					175					180
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
				185					190					195
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				200					205					210
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				215					220					225
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
				230										
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			[SEC ID N° 32]					

147
591

Fig. 2

5					10					15							
Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn
20						25					30					35	
Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe
		40						45					50				
Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val
55					60					65					70		
Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp
	75					80						85				90	
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys
			95						100					105			
Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp
110					115						120					125	
Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala
		130					135					140					
Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg
145					150					155					160		
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys
	165					170					175					180	
Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro
		185						190						195			
Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu
200					205						210					215	
Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val
		220					225						230				
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu
235				240						245					250		
Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu
	255					260						265					270
Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser
		275							280					285			
Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His
290					295						300					305	
Cys	Ile	Ala	Gln	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala
		310					315						320				
Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp
325					330					335					340		
Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser
	345					350						355				360	
Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
		365							370					375			
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys
380					385						390				395		
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu
		400					405					410					
Asn	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys
415					420					425					430		
Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys
		435					440					445				450	
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Gln	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu
		455						460					465				
Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro
470					475						480				485		
Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro

142
592

3/17

Fig. 2 continuación

			490					495					500				
Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala
505					510					515					520		
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln
		525					530					535					540
Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr
				545					550					555			
Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys
	560					565					570					575	
Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val
			580					585									
Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu									

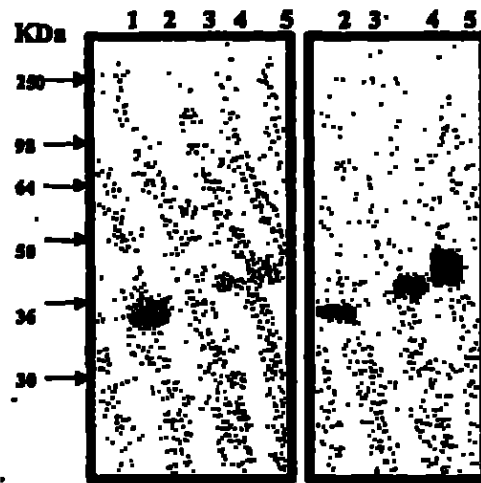
[SEC ID N° 34]

H43
593

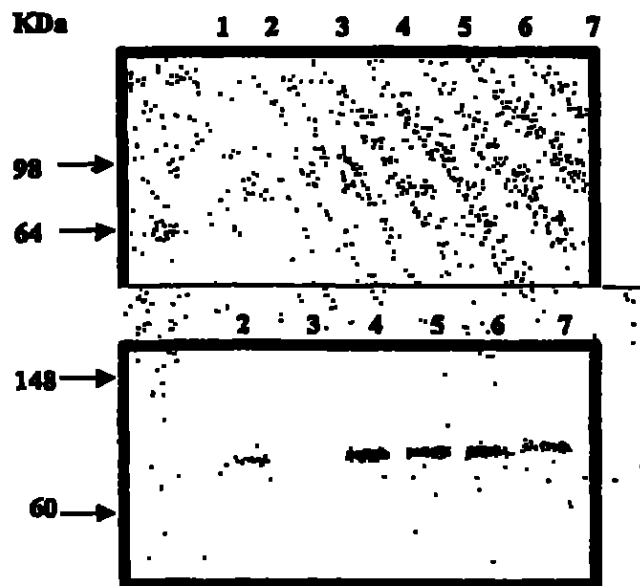
4/17

Fig. 3

A.



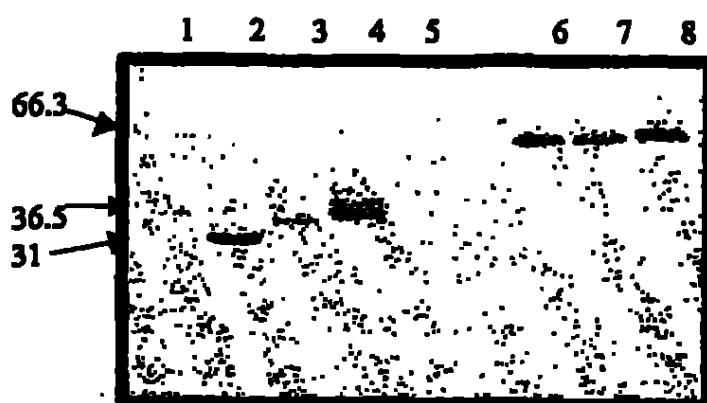
B.



144
544

5/17

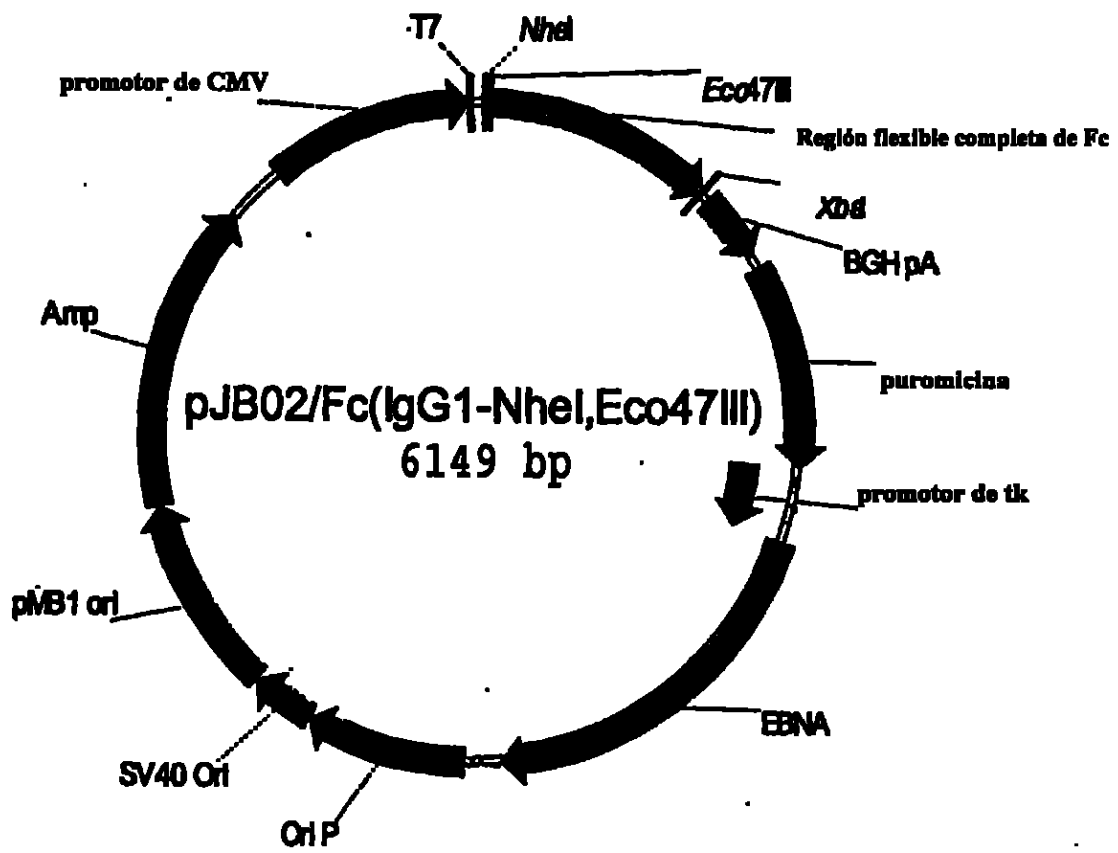
Fig. 4



145
595

6/17

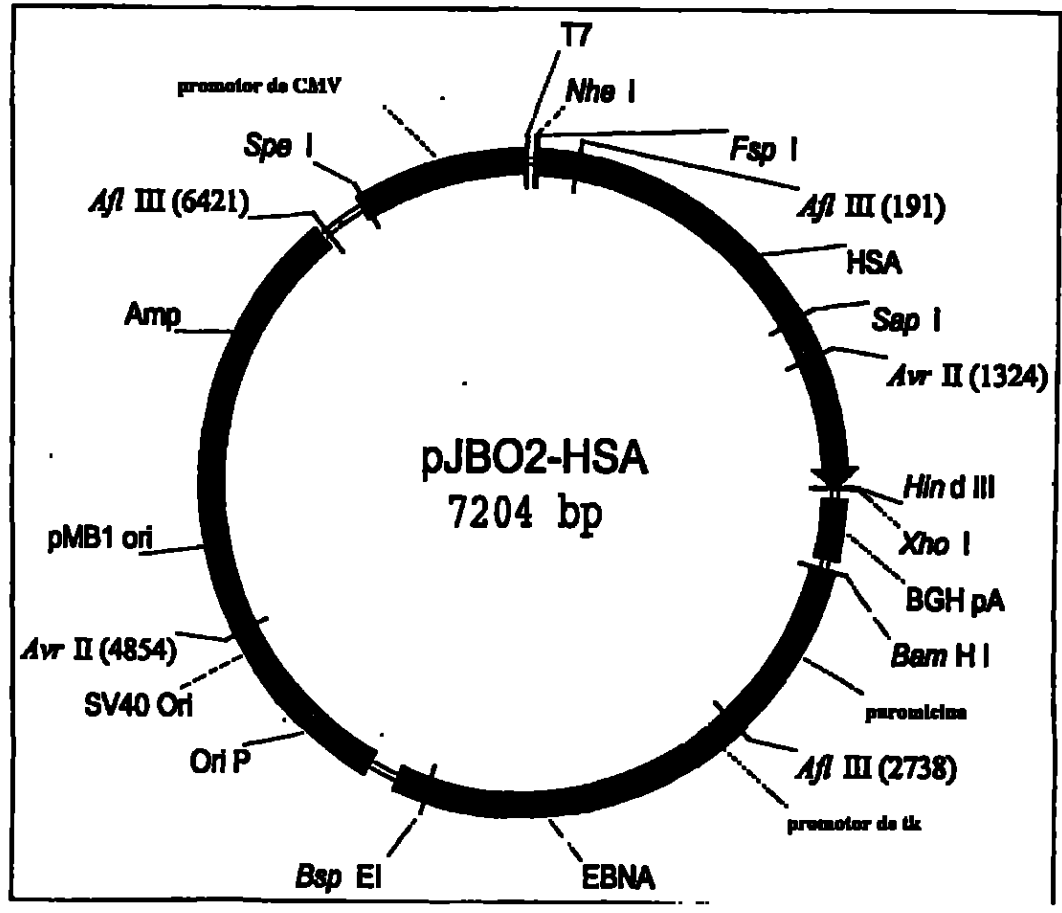
Fig. 5



146
596

7/17

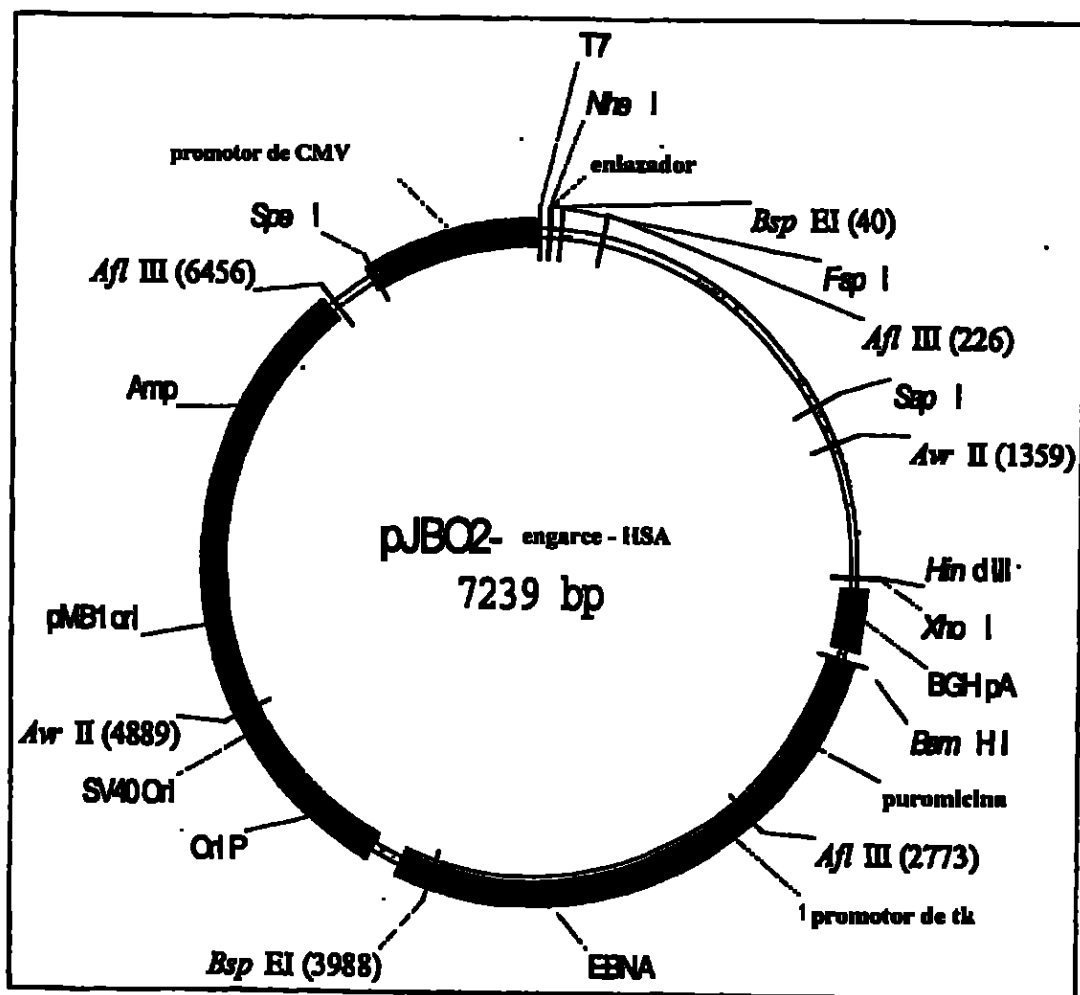
Fig. 6



247
597

8/17

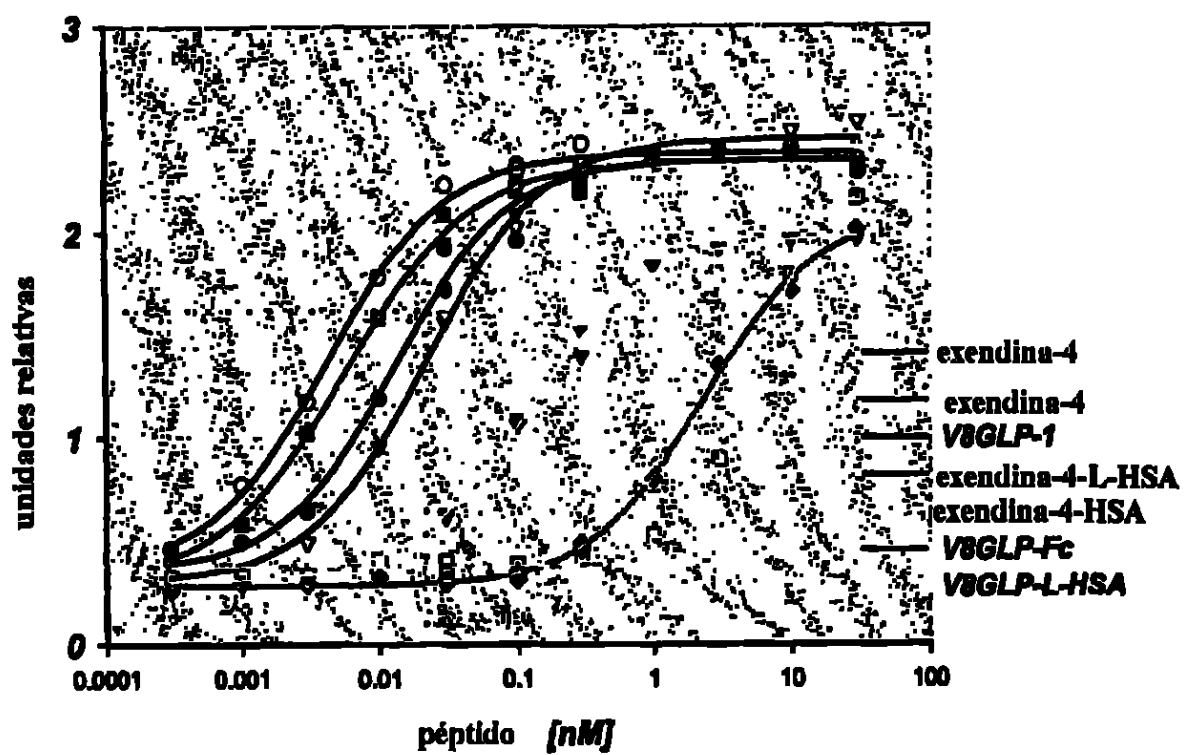
Fig. 7



148
598

9/17

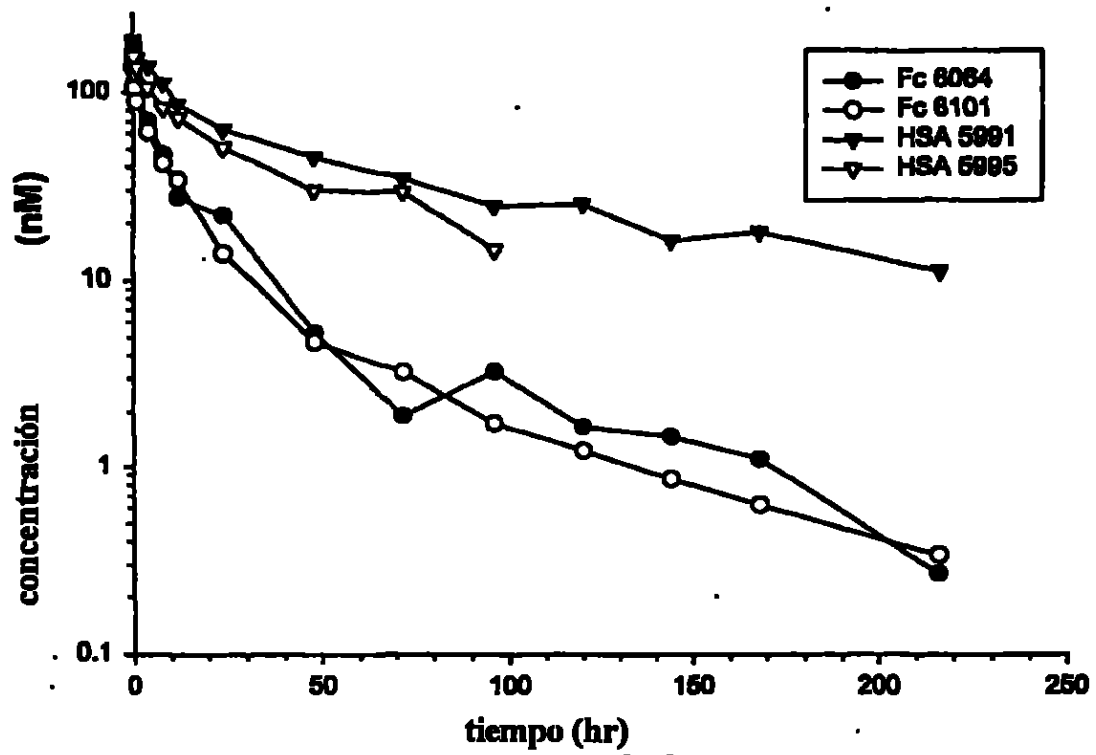
Fig. 8



249
599

10/17

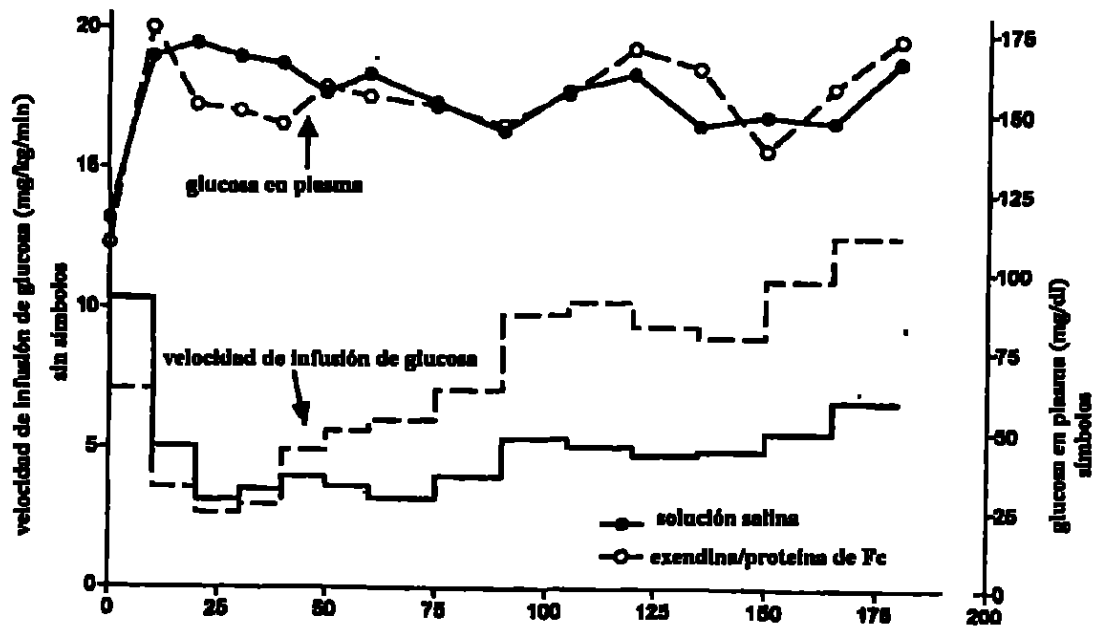
Fig. 9



150
600

11/17

2.

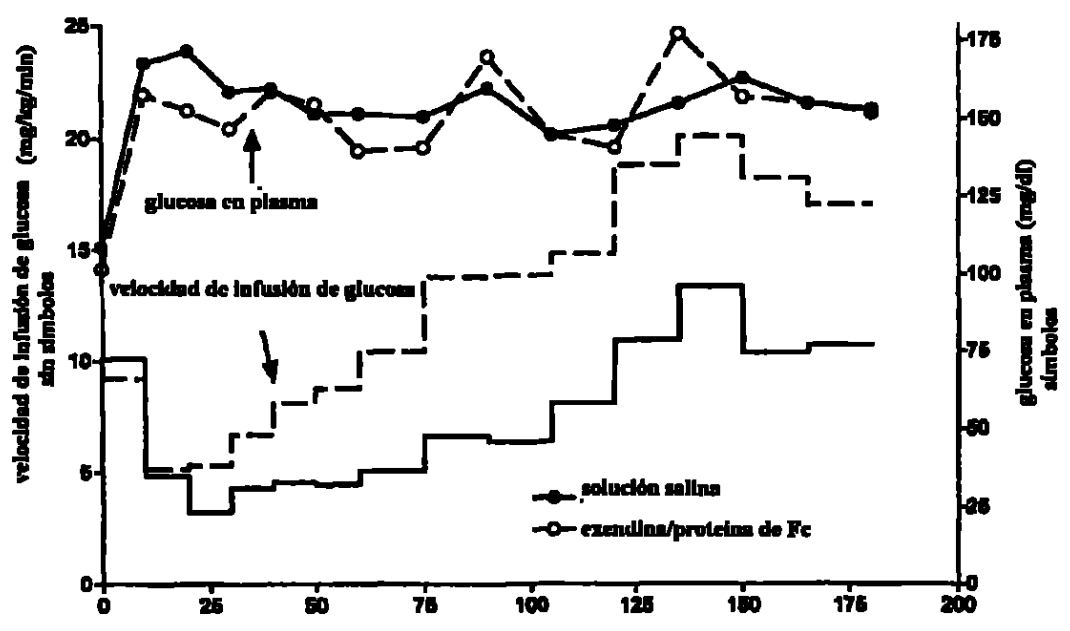


Tiempo desde que comienza la pinza hiperglucémica (min);
inyección de proteína de fusión 2 horas antes del comienzo de la
pinza

12/17

Fig. 10

B.



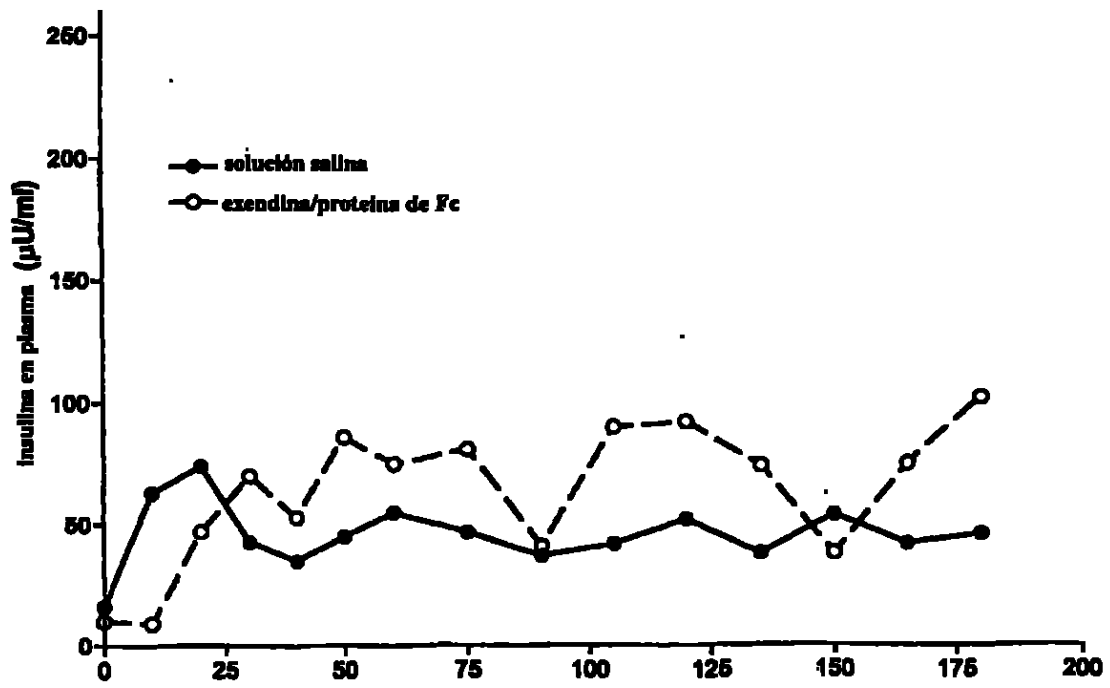
Tiempo desde que comienza la pinza hiperglucémica (min); inyección de proteína de fusión 2 horas antes del comienzo de la pinza

152
602

13/17

Fig. 11

A.



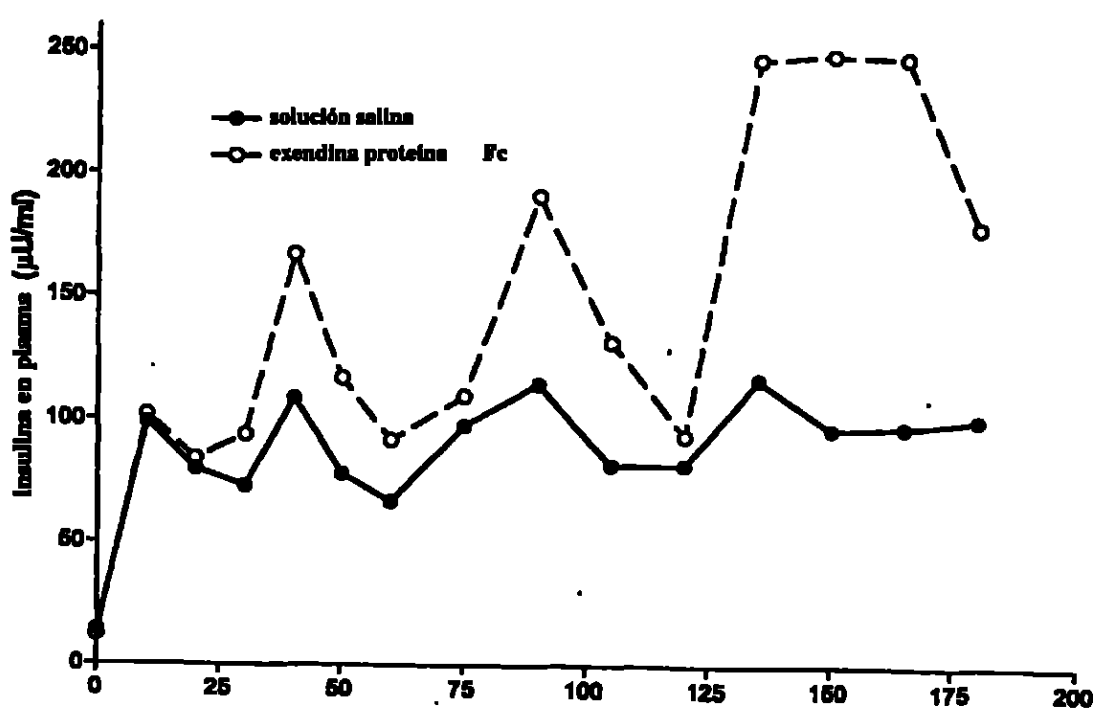
Tiempo desde que comienza la pinza hiperglucémica (min); inyección de proteína de fusión 2 horas antes del comienzo de la pinza

153
603

14/17

Fig. 11

B.



Tiempo desde que comienza la pinza hiperglucémica (min); inyección de proteína de fusión 2 horas antes del comienzo de la pinza

154
604

Fig. 12

1
GAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACC
50
TGAATCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGG
100
ACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGAC
150
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
200
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
250
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
300
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT
350
CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
400
ACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
450
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
500
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
550
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
600
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
650
GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAT
700
AGT [SEC ID N° 33]

755
605

Fig. 13

1
GATGCCGACAAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTGGGAGAAGA
50
AAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGT
100
GTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCA
150
AAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCA
200
TACCCCTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCT
250
ATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAA
300
TGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAG
350
ACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAAATGAAGAGACAT
400
TTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTAT
450
GCCCCGGAACCTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGA
500
ATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAGCTCGATG
550
AACTTCGGGATGAAGGGAAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGT
600
GCCAGTCTCCAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGC
650
TCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAAGTTTCCAAGT
700
TAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTG
750
CTTGAAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAA
800
TCNAGATTGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGT
850
TGAAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCT
900
GACTTGCCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAAGTAAGGATGTTTGCAA
950
AAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGTATGAAT
1000
ATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCTGCTGAGACTTGCC

15b
606

Fig. 13 continuación

1050
AAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCA
1100
TGAATGCTATGCCAAAGTGTTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGC
1150
CTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAG
1200
TACAAATTCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCA
1250
AGTGTCAACTCCAACCTTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGG
1300
GCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAA
1350
GACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAC
1400
GCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACA
1450
GGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAA
1500
GAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTTC
1550
TGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTTGAGCTCGTGA
1600
AACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGAT
1650
TTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTG
1700
CTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAG
1750
GCTTATAATGAC [SEC ID N° 35]

157
607

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Eli Lilly y Compañía
- <120> proteínas de fusión de GLP - 1
- <130> X-13991
- <150> US 60/251,954
- <151> 2000-06-12
- <160> 35
- <170> patente en versión 3.1
- <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> 39
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <220>
- <221> MISC_characteristics

158
608

- <222> (2) . . (2)
- <223> Xaa en la posición 2 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (3) . .(3)
- <223> Xaa en la posición 3 es Glu, Asp o Lys;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (5) . .(5)
- <223> Xaa en la posición 5 es Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (8) . .(8)
- <223> Xaa en la posición 8 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (10) . .(10)
- <223> Xaa en la posición 10 es Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp o Lys;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (11) . .(11)
- <223> Xaa en la posición 11 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (12) . .(12)

159
609

<223> Xaa en la posición 12 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Lys, Trp o Tyr;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (13) . .(13)

<223> Xaa en la posición 13 es Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (14) . .(14)

<223> Xaa en la posición 14 es Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Lys, Trp o Tyr;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (15) . .(15)

<223> Xaa en la posición 15 es Glu, Asp o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (16) . .(16)

<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (17) . .(17)

<223> Xaa en la posición 17 es Gln, Asn, Arg, Glu, Asp o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (18) . .(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (19) . .(19)

<223> Xaa en la posición 19 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (20) . .(20)

<223> Xaa en la posición 20 es Lys, Arg, Gln, Glu, Asp o His;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (21) . .(21)

<223> Xaa en la posición 21 es Leu, Glu, Asp o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (24) . .(24)

<223> Xaa en la posición 24 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (25) . .(25)

<223> Xaa en la posición 25 es Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (26) . .(26)

<223> Xaa en la posición 26 es Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (27) . .(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (28) . .(28)

<223> Xaa en la posición 28 es Asn, Lys, Arg, Glu, Asp o His;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (29) . .(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (30) . .(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Gly, Arg, Lys, Glu, Asp o His;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (31) . .(31)

<223> Xaa en la posición 31 es Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp o Lys o se ha suprimido;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

- <222> (32) . .(32)
<223> Xaa en la posición 32 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp o His o se ha suprimido;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (33) . .(33)
<223> Xaa en la posición 33 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp o His o se ha suprimido;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (34) . .(34)
<223> Xaa en la posición 34 es Gly, Asp, Glu, o Lys o se ha suprimido;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (35) . .(35)
<223> Xaa en la posición 35 es Ala, Phe, Trp, Tyr; Glu, Asp o Lys o se ha suprimido;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (36) . .(36)
<223> Xaa en la posición 36 es Ser, Pro, Lys, Glu o Asp o se ha suprimido;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (37) . .(37)
<223> Xaa en la posición 37 es Ser, Pro, Glu, Asp o Lys o se ha suprimido;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<223> Xaa en la posición 38 es Gly, Pro, Glu, Asp o Lys o se ha suprimido;

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (39) . .(39)

<223> Xaa en la posición 39 es Ala, Ser, Val, Glu, Asp o Lys o se ha suprimido;

<400> 2

His Xaa Xaa Gly Xaa Phe Thr Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Xaa Xnn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 **25** **30**

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

35

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

◀13> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> **(1) . . (1)**

<223> Xaa en la posición 1 es L - histidina, D - histidina o se ha suprimido;

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (2) . .(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

<220>

164
614

- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(3) . .(3)
- <223>

Xaa en la posición 3 es Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu o His;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(5) . .(5)
- <223>

Xaa en la posición 5 es Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys o His;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(6) . .(6)
- <223>

Xaa en la posición 6 es His, Trp, Phe, o Tyr;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(10) . .(10)
- <223>

Xaa en la posición 10 es Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr, Glu o Ala;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(12) . .(12)
- <223>

Xaa en la posición 12 es His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala o Lys;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(13) . .(13)
- <223>

Xaa en la posición 13 es Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;
- <220>

763
615

- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (17) . .(17)
- <223> Xaa en la posición 17 es His, Asp, Lys, Glu, Gln o Arg;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (18) . .(18)
- <223> Xaa en la posición 18 es Glu, Arg, Ala o Lys;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (20) . .(20)
- <223> Xaa en la posición 20 es Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu o His;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (21) . .(21)
- <223> Xaa en la posición 21 es Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (24) . .(24)
- <223> Xaa en la posición 24 es Ala, Glu, Asp, Ser o His;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (25) . .(25)
- <223> Xaa en la posición 25 es Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp o Lys;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA

- <222>

(27) . .(27)
- <223>

Xaa en la posición 27 es Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly o Glu;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(28) . .(28)
- <223>

Xaa en la posición 28 es Glu, Lys o Asp;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(29) . .(29)
- <223>

Xaa en la posición 29 es Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o Glu;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(30) . .(30)
- <223>

Xaa en la posición 30 es Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu o His;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(31) . .(31)
- <223>

Xaa en la posición 31 es Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly o se ha suprimido;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(32) . .(32)
- <223>

Xaa en la posición 32 es Pro o se ha suprimido;

<400> 3

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

<210> 4
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción sintética
<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (1) . (1)
<223> Xaa en la posición 1 es L – histidina, D – histidina o se ha suprimido;

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (2) . (2)
<223> Xaa en la posición 2 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (5) . (5)
<223> Xaa en la posición 5 es Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys o His;

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (6) . (6)
<223> Xaa en la posición 6 es His, Trp, Phe, o Tyr;

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (10) . (10)
<223> Xaa en la posición 10 es Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (16) .. (16)

<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa en la posición 17 es His, Asp, Lys, Glu o Gln;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (18) .. (18)

<223> Xaa en la posición 18 es Glu, His, Ala o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa en la posición 19 es Asp, Lys, Glu o His;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa en la posición 21 es Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (24) .. (24)

<223> Xaa en la posición 24 es Ala, Glu, Asp, Ser o His;

- <220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (27) . . (27)

<223> Xaa en la posición 27 es Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly o Glu;
- <220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (28) . . (28)

<223> Xaa en la posición 28 es Glu, Lys o Asp;
- <220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (29) . . (29)

<223> Xaa en la posición 29 es Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o Glu;
- <220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (30) . . (30)

<223> Xaa en la posición 30 es Arg, Glu o His;
- <220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (31) . . (31)

<223> Xaa en la posición 31 es Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, o se ha suprimido;
- <220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (32) . . (32)

<223> Xaa en la posición 32 es Pro o se ha suprimido;

<400> 4

Xaa Xaa Glu Gly Xaa Xaa Thr Ser Asp Xaa Scr Scr Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15

170
620

Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20

25

30

<210>

5

<211>

32

<212>

PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>

construcción sintética

<220>

<221>

MISC_CHARACTERÍSTICA

<222>

(1) . . (1)

<223>

Xaa en la posición 1 es L – histidina, D – histidina o se ha suprimido;

<220>

<221>

MISC_CHARACTERÍSTICA

<222>

(2) . . (2)

<223>

Xaa en la posición 2 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Met o Thr;

<220>

<221>

MISC_CHARACTERÍSTICA

<222>

(6) . . (6)

<223>

Xaa en la posición 6 es His, Trp, Phe, o Tyr;

<220>

<221>

MISC_CHARACTERÍSTICA

<222>

(10) . . (10)

<223>

Xaa en la posición 10 es Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;

<220>

<221>

MISC_CHARACTERÍSTICA

<222>

(16) . . (16)

17#
621

<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg o Cys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (17) . .(17)

<223> Xaa en la posición 17 es His, Asp, Lys, Glu o Gln;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (20) . .(20)

<223> Xaa en la posición 20 es Asp, Lys, Glu o His;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (24) . .(24)

<223> Xaa en la posición 24 es Ala, Glu, Asp, Ser o His;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (29) . .(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly Pro, His o Glu;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (31) . .(31)

<223> Xaa en la posición 31 es Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly o se ha suprimido;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (32) . .(32)

<223> Xaa en la posición 32 es Pro o se ha suprimido;

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

$\langle 210 \rangle$	6
$\langle 211 \rangle$	32
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	Secuencia artificial

<220>	
<223>	construcción sintética
<220>	
<221>	MISC _ CARACTERÍSTICA
<222>	(1) . . (1)
<223>	Xaa en la posición 1 es L – histidina, D – histidina o se ha suprimido;

<220>	
<221>	MISC_CHARACTERÍSTICA
<222>	(2) ..(2)
<223>	Xaa en la posición 2 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr.

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (16) ..(16)
<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg ó Cys;

<221> MISC_CARACTERÍSTICA
 <222> (17) ..(17)
 <223> Xaa en la posición 17 es His, Asp, Lys, Glu o Gln;

<221> MISC CARACTERÍSTICA

173
623

- <222>

(18) . .(18)
- <223>

Xaa en la posición 18 es Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(24) . .(24)
- <223>

Xaa en la posición 24 es Ala, Glu, Asp, Ser o His;
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(31) . .(31)
- <223>

Xaa en la posición 31 es Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly – Pro, o se ha suprimido.
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222>

(32) . .(32)
- <223>

Xaa en la posición 32 es Pro o se ha suprimido;
- <400>

6
- Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15
- Xaa Xaa Ala Lys Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa Xaa

20 25 30
- <210>

7
- <211>

31
- <212>

PRT
- <213>

Secuencia artificial
- <220>
- <223>

construcción sintética
- <220>
- <221>

MISC_CHARACTERÍSTICA

124
624

<222> (1) . . (1)
<223> Xaa en la posición 1 es L – histidina, D – histidina o se ha suprimido;

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (2) . . (2)
<223> Xaa en la posición 2 es Ala, Gly, Val, Thr, Ile y alfa metil – Ala;

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (15) . . (15)
<223> Xaa en la posición 15 es Glu, Gln, Ala, Thr, Ser y Gly;

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (21) . . (21)
<223> Xaa en la posición 21 es Glu, Gln, Ala, Thr, Ser y Gly;

<400> 7
Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Xaa Gly
1 5 10 15

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

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> construcción sintética
<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (19) . . (19)

175
625

<223> Xaa en la posición 19 es Lys o Arg;

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27) . .(27)

<223> ACETILACIÓN;

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (30) . .(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Gly;

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30) . .(30)

<223> AMIDACIÓN

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 9

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 10

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (1) . .(1)

<223> Xaa en la posición 1 es L – histidina, D – histidina o se ha suprimido;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (2) . .(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly, Ala o Val;

<220>

177
627

- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (10) . .(10)
- <223> Xaa en la posición 10 es Leu o Val;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (12) . .(12)
- <223> Xaa en la posición 12 es Lys o Ser;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (13) . .(13)
- <223> Xaa en la posición 13 es Gln o Tyr;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (14) . .(14)
- <223> Xaa en la posición 14 es Met o Leu;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (16) . .(16)
- <223> Xaa en la posición 16 es Glu o Gln;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (17) . .(17)
- <223> Xaa en la posición 17 es Glu o Gln;

- <220>
- <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
- <222> (19) . .(19)
- <223> Xaa en la posición 19 es Val o Ala;

~~170~~
628

- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (20) . .(20)
<223> Xaa en la posición 20 es Arg o Lys;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (21) . .(21)
<223> Xaa en la posición 21 es Leu o Glu;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (24) . .(24)
<223> Xaa en la posición 24 es Glu o Ala;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (27) . .(27)
<223> Xaa en la posición 27 es Val o Lys;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (28) . .(28)
<223> Xaa en la posición 28 es Asn o Lys;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (30) . .(30)
<223> Xaa en la posición 30 es Gly o Arg; y
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (31) . .(31)
<223> Xaa en la posición 31 es Gly o Pro;

- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (32) . .(32)
<223> Xaa en la posición 32 es Ser o está ausente;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (33) . .(33)
<223> Xaa en la posición 33 es Ser o está ausente;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (34) . .(34)
<223> Xaa en la posición 34 es Gly o está ausente;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (35) . .(35)
<223> Xaa en la posición 35 es Ala o está ausente;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (36) . .(36)
<223> Xaa en la posición 36 es Pro o está ausente;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (37) . .(37)
<223> Xaa en la posición 37 es Pro o está ausente;
- <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (38) . .(38)

180
630

<223> Xaa en la posición 38 es Pro o está ausente;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (39) . (39)

<223> Xaa en la posición 39 es Pro o está ausente;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (39) . (39)

<223> Xaa en la posición 39 es Ser o está ausente;

<400> 11

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

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (1) . (1)

<223> Xaa en la posición 1 es L – histidina, D – histidina o se ha suprimido;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (2) . (2)

181
631

<223> Xaa en la posición 2 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (6) . (6)

<223> Xaa en la posición 6 es Phe, Trp o Tyr;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (10) . (10)

<223> Xaa en la posición 10 es Val, Trp, Ile, Leu, Phe o Tyr;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (12) . (12)

<223> Xaa en la posición 12 es Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (13) . (13)

<223> Xaa en la posición 13 es Tyr, Trp o Phe;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (14) . (14)

<223> Xaa en la posición 14 es Leu, Phe, Tyr o Trp;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (16) . (16)

<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Glu, Asp o Lys;

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<210> 13

<211> 616

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 13

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 Asp
20 25 30

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
35 40 45

Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
50 55 60

Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
65 70 75 80

Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
85 90 95

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
100 105 110

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
115 120 125

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
130 135 140

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
145 150 155 160

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
165 170 175

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
180 185 190

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
195 200 205

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
210 215 220

104

634

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
225 230 235 240

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
245 250 255

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
260 265 270

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
275 280 285

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
290 295 300

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
305 310 315 320

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
325 330 335

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
340 345 350

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
355 360 365

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
370 375 380

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
385 390 395 400

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
405 410 415

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
420 425 430

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
435 440 445

Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
450 455 460

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
465 470 475 480

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
485 490 495

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
500 505 510

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
515 520 525

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
530 535 540

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
545 550 555 560

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
565 570 575

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
580 585 590

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
595 600 605

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
610 615

- <210> 14
- <211> 631
- <212> PKT
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> construcción sintética

<400> 14

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 Gly
20 25 30

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

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

Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys
65 70 75 80

186
636

Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala
85 90 95

Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu
100 105 110

His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu
115 120 125

Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg
130 135 140

Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg
145 150 155 160

Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn
165 170 175

Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His
180 185 190

Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys
195 200 205

Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu
210 215 220

Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala
225 230 235 240

Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala
245 250 255

Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala
260 265 270

Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His
275 280 285

Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala
290 295 300

Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys
305 310 315 320

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile
325 330 335

Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala
340 345 350

107
63+

Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala
355 360 365

Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His
370 375 380

Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu
385 390 395 400

Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr
405 410 415

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn
420 425 430

Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys
435 440 445

Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
450 455 460

Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly
465 470 475 480

Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
485 490 495

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
500 505 510

Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val
515 520 525

Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
530 535 540

Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
545 550 555 560

Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
565 570 575

Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala
580 585 590

Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp
595 600 605

Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
610 615 620

Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630

<210> 15

<211> 640

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 15

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 Ser
20 25 30

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
50 55 60

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

Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys
85 90 95

Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu
100 105 110

Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys
115 120 125

Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp
130 135 140 1

Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His
145 150 155 160

Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp
165 170 175

Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys
180 185 190

109
639

Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
195 200 205
Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys
210 215 220
Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu
225 230 235 240
Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala
245 250 255
Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala
260 265 270
Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys
275 280 285
Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp
290 295 300
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
305 310 315 320
Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys
325 330 335
Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
340 345 350
Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys
355 360 365
Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
370 375 380
Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
385 390 395 400
Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
405 410 415
Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
420 425 430
Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
435 440 445
Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
450 455 460

190
640

Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
465 470 475 480

Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
485 490 495

Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
500 505 510

Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
515 520 525

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
530 535 540

Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
545 550 555 560

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
565 570 575

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
580 585 590

Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
595 600 605

Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
610 615 620

Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630 635 640

- <210> 16
- <211> 624
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 16

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

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

191
641

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

192
642

Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys
305 310 315 320

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
325 330 335

Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys
340 345 350

Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
355 360 365

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
370 375 380

Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
385 390 395 400

Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
405 410 415

Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
420 425 430

Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
435 440 445

Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
450 455 460

Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
465 470 475 480

Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
485 490 495

Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
500 505 510

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
515 520 525

Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
530 535 540

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
545 550 555 560

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
565 570 575

193
643

Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
580 585 590

Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
595 600 605

Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
610 615 620

<210> 17

<211> 640

<212> PKT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 17

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
50 55 60

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

Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys
85 90 95

Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu
100 105 110

Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys
115 120 125

Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp
130 135 140

Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His
145 150 155 160

194
644

Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp
165 170 175

Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys
180 185 190

Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
195 200 205

Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys
210 215 220

Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu
225 230 235 240

Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala
245 250 255

Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala
260 265 270

Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys
275 280 285

Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp
290 295 300

Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
305 310 315 320

Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys
325 330 335

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
340 345 350

Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys
355 360 365

Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
370 375 380

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
385 390 395 400

Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
405 410 415

Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
420 425 430

195
645

Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
435 440 445
Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
450 455 460
Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
465 470 475 480
Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
485 490 495
Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
500 505 510
Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
515 520 525
Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
530 535 540
Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
545 550 555 560
Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
565 570 575
Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
580 585 590
Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
595 600 605
Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
610 615 620
Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630 635 640

<210> 18

<211> 264

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

196
646

<400> 18

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 Ala
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
35 40 45

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
50 55 60

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

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

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

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
115 120 125

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260

197
647

<210> 19

<211> 272

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 19

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 Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

198
648

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

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

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

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

<210> 20
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> construcción sintética

<400> 20

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 Ala
 20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 35 40 45

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 50 55 60

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

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

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

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 115 120 125

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260

<210> 21
<211> 272
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> construcción sintética
<400> 21

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 Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
50 55 60

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

200
650

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

- <210> 22
- <211> 272
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 22

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

201
651

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

<210> 23

202
652

<211> 287

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

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

203
653

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
225 230 235 240

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
245 250 255

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
260 265 270

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 24
<211> 284
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> construcción sintética ..
<400> 24

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 Ser
20 25 30

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

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

Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
65 70 75 80

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
100 105 110

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

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

204
654

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

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

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

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
195 200 205

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

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

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

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
260 265 270

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
275 280

- <210> 25
- <211> 302
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> construcción sintética

<400> 25

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 Ser
20 25 30

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

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

205
655

gly gly gly gly ser ala glu pro. lys ser cys asp lys thr his thr
65 70 75 80

cys pro pro cys pro ala pro glu leu leu gly gly pro ser val phe
85 90 95

leu phe pro pro lys pro lys asp thr leu met ile ser arg thr pro
100 105 110

glu val thr cys val val val asp val ser his glu asp pro glu val
115 120 125

lys phe asn trp tyr val asp gly val glu val his asn ala lys thr
130 135 140

lys pro arg glu glu gln tyr asn ser thr tyr arg val val ser val
145 150 155 160

leu thr val leu his gln asp trp leu asn gly lys glu tyr lys cys
165 170 175

lys val ser asn lys ala leu pro ala pro ile glu lys thr ile ser
180 185 190

lys ala lys gly gln pro arg glu pro gln val tyr thr leu pro pro
195 200 205

ser arg glu glu met thr lys asn gln val ser leu thr cys leu val
210 215 220

lys gly phe tyr pro ser asp ile ala val glu trp glu ser asn gly
225 230 235 240

gln pro glu asn asn tyr lys thr thr pro pro val leu asp ser asp
245 250 255

gly ser phe phe leu tyr ser lys leu thr val asp lys ser arg trp
260 265 270

gln gln gly asn val phe ser cys ser val met his glu ala leu his
275 280 285

asn his tyr thr gln lys ser leu ser leu ser pro gly lys
290 295 300

<210> 26

<211> 294

<212> PKT

206
656

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 26

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

207
654

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
245 250 255
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
260 265 270
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
275 280 285
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290

- <210> 27
- <211> 280
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 27

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

208
658

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
145 150 155 160
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
165 170 175
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
180 185 190
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
195 200 205
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
210 215 220
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
225 230 235 240
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
245 250 255
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
260 265 270
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280

<210> 28

<211> 287

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 28

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 85 90 95
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 115 120 125
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 130 135 140
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 145 150 155 160
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 165 170 175
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 180 185 190
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 195 200 205
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 210 215 220
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 225 230 235 240
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 245 250 255
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 260 265 270
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275 280 285
 <210> 29
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

210
660

X-

<220>

<223> construcción sintética

<400> 29

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2H
661

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

<210> 30

<211> 272

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 30

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

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

Ser Gly Ala Ser Ser Gly Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

272
662

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 287

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 31

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
50 55 60

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
65 70 75 80

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
85 90 95

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
100 105 110

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
115 120 125

2B
663

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
130 135 140
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
145 150 155 160
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
165 170 175
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
180 185 190
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
195 200 205
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
210 215 220
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
225 230 235 240
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
245 250 255
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
260 265 270
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 32
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32.
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
Ala Pro Glu Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Asp Thr Lys Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

214
664

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

<210> 33

<211> 703

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

gagcccaant cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg	60
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg	120
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	180
aactggtaag tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caagccgcg ggaggagcag	240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	300
ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aagccctcc cagcccccac cgagaaaacc	360

215
665

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 420
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatgat agt 703

<210> 34
<211> 585
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30
Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Asn Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

27
667

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 35
<211> 1762
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
gatgcgcaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaagatt tgggagaaga aaatttcaa 60
gccttggtgt tgattgcctt tgctcagtat ctccagcagt gtccatttga agatcatgta 120
aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa 180
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt 240
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaac aagaacctga gagaantgan 300
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaacca aacctcccc gattggtgag accagaggtt 360
gatgtgatgt gcactgcttt tcatgacaat gaagagacat tttgaaaaa atacttatat 420
gaaattgcca gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt tgctaaaagg 480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctgttgcca 540
aagctcgatg aacttcggga tgaagggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaagtgt 600

gccagtcctcc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtagc tcgcctgagc 660
 cagagatttc ccaaagctga gtttgcagaa gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaaa 720
 gtccacacgg aatgctgcc aaggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt 780
 gccaaagtata tctgtgaaa tcaagattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa 840
 aaacctctgt tggaaaaatc ccactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgcctgct 900
 gacttgcctt cattagctgc tgattttgtt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct 960
 gaggcaaagg atgtcttcct gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcctcctgat 1020
 tactctgtcg tgctgtgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc 1080
 tgtgccgctg cagatctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctctt 1140
 gtggaagagc ctcagaattt aatcaaacaa aattgtgagc tttttgagca gcttggagag 1200
 tacaatttcc agaatgcgct attagttcgt tacaccaaga aagtaccca agtgtcaact 1260
 ccaactcttg tagaggtctc aagaaacctt ggaaaagtgg gcagcaaatg ttgtaaacat 1320
 cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggctct gaaccagtta 1380
 tgttgtttgc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca ccaatgctg cacagaatcc 1440
 ttggtgaaca ggcgacctg cttttcagct ctggaagtgc atgaaacata cgttcccaa 1500
 gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag 1560
 agacaaatca agaacaacac tgcaattgtt gagctcgtga aacacaagcc caaggcaaca 1620
 aaagagcaac tgaagctgt tatggatgat ttgcagctt ttgtagagaa gtgctgcaag 1680
 gctgacgata aggagacctg ctttgcgag gagggtaaaa aactgtttgc tgcaagtcaa 1740
 gctgccttag gcttataatg ac 1762